

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Kateřina Kratochvílová

Interakce virové RNA s kapsidovým proteinem v prostředí *in vivo* a biotechnologické využití vzniklých částic

Coat protein-RNA interaction *in vivo* and the biotechnological use of VLPs

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 13. 8. 2018

.....

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli Mgr. Tomáši Moravcovi, Ph.D. za veškerou pomoc při tvorbě této práce, za nekonečnou trpělivost, neobyčejnou ochotu a všechny čas, který mi věnoval při řešení jakéhokoli problému. Samozřejmě také za cenné rady a mnohé diskuse při řešení této práce. Dále bych také ráda poděkovala doc. RNDr. Noemi Čerovské, CSc. za cenné rady, ochotu vždy pomoci, podporu a čas, který mi při řešení práce věnovala. Děkuji také panu RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za konzultace, rady a věcné připomínky.

Nemalý dík patří také Ing. Jitce Svobodové za pomoc při práci v laboratoři a zaučení do základních laboratorních metod, a také celému týmu laboratoře za přátelskou atmosféru a příjemné pracovní prostředí, které v laboratoři vždy panovalo.

Ráda bych poděkovala své rodině a partnerovi za podporu a motivaci ke studiu a za to, že jsou a budou mi mnohdy v životě velkým vzorem. Děkuji mým přátelům a všem, kteří mě podporovali.

Abstrakt

Virus tabákové mozaiky (TMV) je jednoduchý a široce používaný modelový virus, který je zkoumán již více než 130 let. Díky intenzivnímu studiu tohoto viru dnes známe podrobnosti z jeho infekčního cyklu, známe genom i strukturu vytvořené virové částice a stejně tak i mechanismus její tvorby. Proces tvorby virové částice (enkapsidace) je uspokojivě popsán v *in vitro* podmínkách. V *in vitro* podmínkách byl identifikován počátek sbalování částice (OAS, origin of assembly), nacházející se uvnitř genu pro pohybový protein (MP, movement protein). Pro vznik částic byl také předpokládán význam replikačních center tzv. replikačních továren.

Cílem diplomové práce bylo studium specifčnosti interakce RNA a kapsidového proteinu při tvorbě částic přímo v rostlinách. Experimenty měly za cíl ověřit nutnost přítomnosti sekvence OAS při iniciaci virové enkapsidace, a také vliv buněčné kompartmentace na tento proces. Pomocí několika virových systémů (viru tabákové mozaiky, X viru bramboru, viru žluté zakrslosti fazolu a viru mozaiky vigny), byly vytvořeny genové konstrukty, umožňující tuto problematiku studovat na molekulární úrovni.

Výsledky ukázaly, že interakce RNA s kapsidovým proteinem je specifická. Ke vzniku částic docházelo pouze při interakci virové RNA s kapsidovým proteinem (CP, capsid protein) dříve (originálně) kódovaným na virové RNA (např. TMV-RNA + TMV-CP). Dále bylo potvrzeno, že částice viru vznikají, i když se v dané RNA nenachází klíčová sekvence OAS. Z pozorování se zdá, že všechny komponenty nutné pro sbalení částice nemusí vznikat v prostorech replikačních továren. Kompartmentace buněk pravděpodobně nemá takovou úlohu, jak se dle experimentů provedených v prostředí *in vitro* zdálo.

Klíčová slova: Virus tabákové mozaiky, TMV, kapsidový protein, rostlinný virus, nanočástice, virový konstrukt, OAS

Abstract

The Tobacco mosaic virus (TMV) is a simple and frequently used model virus which has been studied already more over than 130 years. Due to the intensive study of this virus the details of its infectious cycle, genomic information and also the structure of the created viral particle as well as the mechanism of its creation are known today. The process of encapsidation (viral particle formation) is sufficiently described in the *in vitro* conditions. In the *in vitro* conditions the origin of assembly (OAS) was also described. The OAS was identified in the coding sequence of the gene for the movement protein (MP). The importance of replication centers (replication factories) has also been supposed.

The aim of the diploma thesis was to study the specificity of the interaction of RNA and coat protein in the process of the particle assembly taking place directly inside the plants. The experiments were performed to verify the necessity of presence of OAS sequence in process of initiation of viral encapsidation. The effect of the cell compartmentation on this process has also been studied.

Based on several viral systems (the Tobacco mosaic virus, the Potato virus X, the Bean yellow dwarf virus and Cowpea mosaic virus) gene constructs were created. These constructs enables to study this idea at the molecular level.

The results showed that the interaction of the RNA with the coat protein is specific. The virus particles are assembled even if the OAS sequence is not found in the RNA sequence. It seems that all of the components necessary for assembly of the particle do not have to be produced in the premises of the replication factories. Compartmentation of cells probably does not have that role as was originally supposed.

Key words: Tobacco mosaic virus, TMV, coat protein, plant virus, nanoparticle, viral vector, OAS

Obsah

1	Úvod	1
2	Literární úvod	3
2.1	Virus tabákové mozaiky	3
2.1.1	Taxonomie viru	3
2.1.2	Genomová informace	3
2.1.3	Replikace	4
2.2	Struktura virové částice	5
2.2.1	Uspořádávání virové částice.....	5
2.3	X virus bramboru (PVX)	10
2.3.1	Taxonomie viru	10
2.3.2	Genomová informace	10
2.4	Virus žluté zakrslosti fazolu (BeYDV)	11
2.4.1	Taxonomie viru	11
2.4.2	Genomová informace	11
2.5	Virus mozaiky vigny (CPMV)	12
2.5.1	Taxonomie viru	12
2.5.2	Genomová informace	12
2.6	Biotechnologické využití virových částic.....	13
2.6.1	Biotechnologické využití viru tabákové mozaiky	13
2.6.2	Biotechnologické využití viru žluté zakrslosti fazolu (BeYDV)	14
2.6.3	Biotechnologické využití viru mozaiky vigny (CPMV)	14
2.7	Tvorba genových konstruktů	16
2.7.1	Metoda GoldenBraid	16
2.7.2	Mechanismus tvorby GoldenBraid konstruktů	16
2.7.3	Domestikace a tvorba základních GB částí („GB parts“)	17
2.7.4	Klonování do cílového plazmidu a vznik transkripční jednotky.....	18
3	Materiál a metody	20
3.1	Materiál.....	20
3.1.1	Rostlinný materiál	20
3.1.2	Bakteriální kmeny a viry	20
3.1.3	Kompetentní bakteriální buňky	21
3.1.4	Kultivační a infiltrační média.....	21
3.1.5	Antibiotika.....	22

3.1.6	Pufry	22
3.1.7	Barvicí roztoky	23
3.1.8	Komerční soupravy	23
3.1.9	Enzymy a příslušné pufry	23
3.1.10	Protilátky	24
3.1.11	Primery	24
3.1.12	Molekulové markery	24
3.1.13	Výchozí plazmidy pro přípravu konstruktů	24
3.2	Metody	29
3.2.1	Tvorba genových konstruktů pomocí metody GoldenBraid	29
3.2.2	Práce s bakteriálními kulturami	32
3.2.3	Metody založené na práci s nukleovou kyselinou	33
3.2.4	Přenos genových konstruktů do experimentálních rostlin	38
3.2.5	Sběr a zpracování rostlinného materiálu	39
3.2.6	Metody založené na práci s proteiny	40
4	Výsledky	45
4.1	Tvorba genových konstruktů	45
4.2	Provedené experimenty	52
4.2.1	Detekce virového kapsidového proteinu (CP)	52
4.2.2	Studium významu buněčné kompartmentace při vzniku virových částic	52
4.2.3	Koinfiltrace rostlin konstrukty se zaklonovaným vizuálním markerem	55
4.2.4	Studium významu sekvence OAS při vzniku virových částic	58
4.2.5	Využití konstruktů, založených na pRIC systému virových vektorů	68
4.2.6	Zobrazení částic (VLPs) TMV transmistním elektronovým mikroskopem	70
5	Diskuse	71
6	Seznam literatury	77

Seznam zkratek

Zkratka	Anglický název	Český název
3'NTR	3'Non-Translated Region	3' nepřekládaná oblast
5'NTR	5'Non-Translated Region	5' nepřekládaná oblast
BeYDV	Bean Yellow Dwarf Virus	Virus žluté zakrslosti fazolu
bp	Base pair	Páry bází
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus	Virus mozaiky kvěťáku
CBB	Coomassie Brilliant Blue	Coomassie Brilliant Blue
CP	Coat Protein	Kapsidový protein
CPMV	Cowpea mosaic virus	Virus mozaiky vigny
ddH ₂ O	Ultra pure and sterile water	Destilovaná a demineralizovaná voda
dH ₂ O	Distilled water	Destilovaná voda
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	Deoxyribonukleová kyselina
cDNA	Complementary DeoxyriboNucleic Acid	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Double stranded DNA	Dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
ssDNA	Single stranded DNA	Jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate	Deoxynukleosid trifosfát
dsRED	Red fluorescent protein	Červený fluorescenční protein
GB	GoldenBraid	GoldenBraid
GFP	Green Fluorescence Protein	Zelený fluorescenční protein
kb	Kilobases	Kilobase
kDa	KiloDalton	KiloDalton
LIR	Long Intergenic Region	Dlouhá intergenová struktura
LB	Luria-Bertani	Luria-Bertani
MP	Movement Protein	Pohybový protein
OAS	Origin of Assembly	Počátek sbalování
OD	Optical Density	Optická densita
ORF	Open Reading Frame	Otevřený čtecí rámec
PBS	Phosphate-buffered saline	Fosfátový pufr
PCR	Polymerase Chain Reaction	Polymerázová řetězová reakce
primer F	Primer forward	Primer přímý
primer R	Primer reverse	Primer zpětný

PVX	Potato virus X	X virus bramboru
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	Na RNA závislá RNA polymeráza
RNA	RiboNucleic Acid	Ribonukleová kyselina
ssRNA	Single strand RiboNucleic Acid	Jednovláknová RNA
mRNA	Messenger RNA	Messenger RNA
sgRNA	Subgenomic RiboNucleic Acid	Subgenomová RNA
tRNA	Transfer RNA	Transferová RNA
RT	Reverse Transcription	Reverzní transkripce
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SIR	Short Intergenic Region	Krátká intergenová struktura
TBE	Tris/Borate/EDTA buffer	Tris/borát/EDTA pufr
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethan-1,2-diamin	N, N, N', N'-tetramethylethan-1,2-diamin
TEM	Transmission Electron Microscopy	Transmisní elektronová mikroskopie
TMV	Tobacco Mosaic Virus	Virus tabákové mozaiky
ÚEB AVČR	The Institute of Experimental Botany AS CR	Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky
VLPs	Virus-Like Particles	Viru podobné částice
WT	Wild type	Divoký typ
YFP	Yellow Fluorescent Protein	Žlutý fluorescenční protein

1 Úvod

Viry jsou obecně považovány za velmi malé buněčné parazity na pomezí mezi složitými chemickými sloučeninami a jednoduchými organismy. Genomy virů mohou být založeny jak na RNA, tak i DNA mnoha různých formátů. Viry nejsou schopny se množit bez hostitelské buňky. Velká většina rostlinných virů obsahuje genom ve formě pozitivní jednovláknové RNA ((+) ssRNA). Tato jednovláknová RNA slouží po vstupu do cytoplasmy hostitelské buňky jako mRNA a může být tedy rovnou translatována a využita pro tvorbu virových proteinů a nových částic. Ani vybraný modelový virus tabákové mozaiky není výjimkou.

Samotná tvorba virové částice (enkapsidace) je v *in vitro* podmínkách již dlouhou dobu podrobně popsáným a jasně definovaným úsekem životního cyklu viru. Rostliny jsou ale velmi komplexní systémy, které se od podmínek v laboratorním *in vitro* prostředí mohou v některých případech podstatně lišit. Na základě předchozích experimentů, provedených v Laboratoři virologie ÚEB AVČR, ve kterých byla z virové RNA odstraněna klíčová sekvence pro započetí enkapsidace OAS vyplývá, že tato sekvence není pro vytvoření částice zcela nezbytná, jak předpokládal původní model. K enkapsidaci docházelo i bez této sekvence a fenotyp viru nebyl nijak ovlivněn. Můžeme předpokládat, že celý mechanismus tvorby částic uvnitř rostlinných buněk neprobíhá stejným způsobem, jako v *in vitro* prostředí.

Studium specifčnosti enkapsidace virové RNA a tvorby částic v *in vivo* podmínkách byly hlavním předmětem zkoumání mé experimentální práce. Správné pochopení procesu tvorby částic v živém rostlinném materiálu by mohlo mít velký význam pro biotechnologické využití viru tabákové mozaiky.

Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo na základě navržených experimentů upřesnit specifickou procesy enkapsidace (tvorby virové částice) v podmínkách *in vivo*.

Dílčí cíle

- 1) Vytvořit genové konstrukty různých vlastností, založené na systému několika rostlinných virů.
- 2) Zhodnotit vliv specifické sekvence OAS v průběhu iniciace virové enkapsidace.
- 3) Zhodnotit vliv buněčné kompartmentace na tvorbu částic.
- 4) Detekovat a ověřit infekčnost vzniklých virových částic.

Hypotézy

- Pro správné uspořádání virové částice je nutná specifická sekvence OAS, která se nachází na virové RNA v blízkosti jejího 3' konce.
- Pro vytvoření částice je s velkou pravděpodobností nutná tvorba jednotlivých komponent celého mechanismu v tzv. replikačních továrnách ohraničených membránou (závislost na buněčné kompartmentaci).

2 Literární úvod

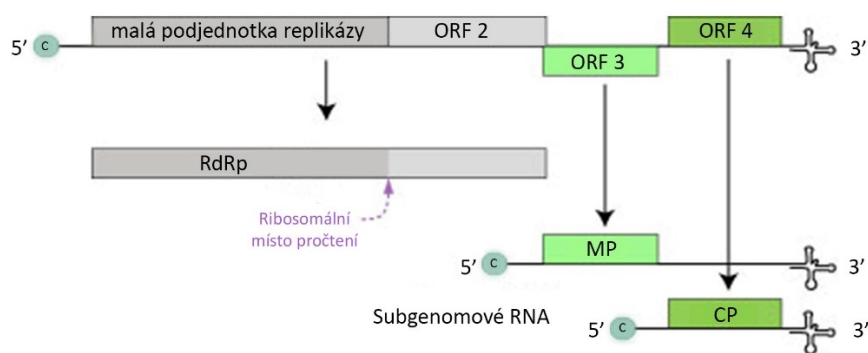
2.1 Virus tabákové mozaiky

2.1.1 Taxonomie viru

Virus tabákové mozaiky patří do rodiny *Virgaviridae* a rodu *Tobamovirus*. Virion obsahuje jednovláknovou molekulu RNA s kladnou polaritou ((+) ssRNA) a řadí se tak do IV. skupiny podle Baltimorovy klasifikace (King *et al.*, 2011).

2.1.2 Genomová informace

Genom viru tabákové mozaiky je kódován ssRNA, jejíž délka je cca 6395 nukleotidů. Na 3' konci nelze nalézt polyA sekvenci, nachází se zde 3'NTR oblast, jejíž délka je 204 nukleotidů a s největší pravděpodobností zaujímá strukturu jetelového listu, podobně jako tRNA. (Goelet *et al.*, 1982; Cann, 2011). Funkčně je tato TMV 3'NTR podobná klasickému polyA konci, protože prokazatelně zvyšuje stabilitu a míru translace virové mRNA. Pro svou funkčnost musí být, stejně jako polyA sekvence, umístěna na 3' konci RNA (Gallie & Walbot, 1990). Na 5' konci se nalézají klasická methylguanodinová čepička (m⁷G5'ppp5'Gp) (Zimmern, 1975). Genomová struktura viru je zobrazena na Obrázku 1.



Obrázek 1: Genomová struktura viru tabákové mozaiky, (převzato a upraveno z: www.viralzone.expasy.org/51?outline=all_by_species)

Genomová RNA nese informaci pro 4 proteiny: RdRp polymerázu (z genu vznikají dva různé proteiny), pohybový protein (MP) a kapsidový protein (CP). Polymeráza je kódována dvěma otevřenými čtecími rámci, 124–132 kDa a 181–189 kDa velkými. Proteiny pro replikázu jsou

translatovány přímo z genomové RNA. Zbývající dva otevřené čtecí rámce nesou informaci pro 28–31 kDa pohybový protein (MP) a 17–18 kDa kapsidový protein (CP). Oba tyto proteiny jsou syntetizovány translací z jejich sgRNA (subgenomové RNA). Obě sgRNA obsahují čepičkovou methylovanou strukturu na jejich 5' konci a jetelovou vlásenkovitou strukturu na 3' konci (viz obrázek 1) (Cann, 2011). Celá genomová informace viru tabákové mozaiky byla osekvenována již roku 1982 mezi prvními genomy v historii (Goelet *et al.*, 1982).

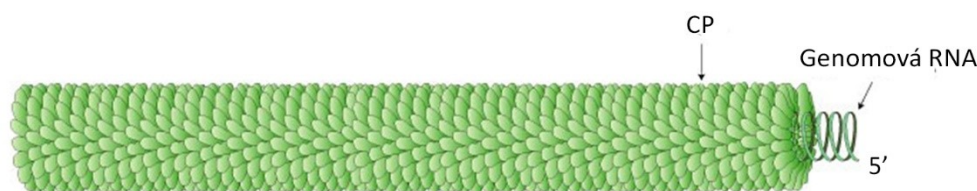
2.1.3 Replikace

Virus tabákové mozaiky nemá známého vektora a do rostlinného organismu vstupuje přes mechanická poškození. Nukleová kyselina viru je, jak již bylo zmíněno (+) ssRNA, což viru přináší značnou výhodu. Po vstupu infekční částice do buňky slouží tato nukleová kyselina jako mRNA a může být tedy buněčným translačním aparátem přímo translatována. Dochází relativně rychle k syntéze virových proteinů a nukleové kyseliny v cytoplasmě hostitele. Množení viru probíhá uvnitř buňky ve specifických strukturách, odvozených nejčastěji z endoplasmatického retikula, tzv. replikačních továrnách. Tyto továrny vytvářejí ohraničený, chráněný prostor, ve kterém se virus může množit do vysokých titrů (Más & Beachy, 1999).

2.2 Struktura virové částice

Struktura (viz Obrázek 2) a biochemie virové částice viru tabákové mozaiky byla poprvé zmíněna v práci W. M. Stanleyho, který v roce 1935 izoloval čisté krystalické proteiny tohoto rostlinného patogena. Dal tak poznání o struktuře virové částice nový směr a vzbudil zájem vědeckých skupin (Stanley, 1935). Následujícími velkými kroky pro odhalení struktury virionu byly experimenty, používající pro vizualizaci virionu a navržení modelu virové částice metodu X- paprskové rentgenové difrakce (Bernal & Fankuchen, 1941; Franklin & Klug, 1955; Franklin *et al.*, 1957). Díky těmto pracím byly navrženy modely, které obsahovaly RNA a kapsidové proteiny v prostorovém uspořádání, které známe dodnes, s minimálními změnami. K dalšímu rozvoji bádání v této oblasti bezpochyby přispěla konstrukce a vývoj elektronového mikroskopu Ernestem Ruskou v roce 1931 (Knoll & Ruska, 1932). Historicky první fotografické snímky helikálního tyčinkovitého virionu z elektronového mikroskopu však byly zveřejněny až o několik let později (Kausche *et al.*; 1939).

Viriony TMV zaujímají strukturu jednoduché tyčinky s vnitřní dutinou, mající průměr 4 nm. Ve virionu je uložena genomová (+) ssRNA ve spirále o průměru přibližně 8 nm. Na tuto RNA šroubovici nasedají podjednotky kapsidového proteinu. Délka částice činí 300 nm a její šířka je v průměru 19 nm (Klug, 1979; Namba *et al.*, 1989). Kapsidový protein plní funkci ochrany virové nukleové kyseliny, jedna proteinová podjednotka je navázána na 3 RNA báze. Každá úplná infekční částice je proto složena z 2133 proteinových podjednotek CP (Ding *et al.*, 1999).



Obrázek 2: Struktura virové částice viru tabákové mozaiky (TMV), (převzato z: viralzone.expasy.org.)

2.2.1 Uspořádávání virové částice

Vědecké poznání nejen v oblasti virologie, ale také napříč biologickými obory, se mnohdy nemalou měrou inspirovalo výzkumy prováděnými na rostlinných virech. Především na vybraném modelovém systému viru tabákové mozaiky. Oproti jiným systémům nabízí tento virus mnoho výhod, které usnadňují a výrazně urychlují práci v laboratoři. Mohli bychom zmínit jeho jednoduchost, tvar virionů, formu genomové informace, množení ve vysokých titrech, jednoduchou kultivaci ve srovnání s jinými viry a v neposlední řadě také rychlost tvorby

nových částic. Koncem 19. století Beijerinck ve své práci poprvé označil infekční agens způsobující přenosnou mozaiku na tabákových listech slovem „virus“. Vytvořil tak důležitý milník ve vědecké historii (Beijerinck, 1898). Se strukturou a uspořádáním částice TMV je spojeno také rozpoznání a popsání vůbec první anatomické struktury viru obecně (Bloomer *et al.*, 1978).

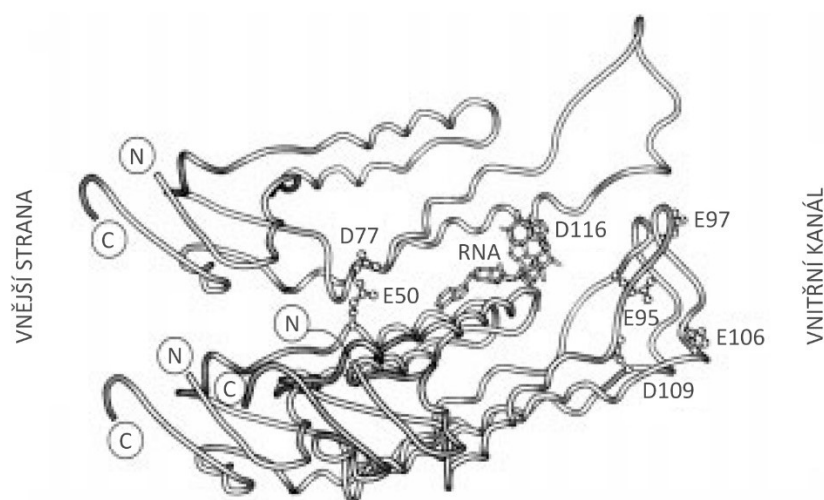
Virion TMV je tvořen mechanismem virového assembly (uspořádávání částice). Tento proces je zkoumán od 70. let 20. století a je tedy v *in vitro* podmínkách velmi dobře objasněn. Pro tvorbu jednotlivých částic je nutné v rostlinných buňkách poskytnout RNA, kapsidový protein (CP) a pohybový protein (MP). Při vzniku částice se na tři nukleotidy virové RNA vždy naváže jedna podjednotka CP (Stubbs *et al.*, 1977).

2.2.1.1 Pohybový protein (MP)

Pohybový protein (MP) o velikosti 30 kDa je tvořen ze subgenomové RNA. Hlavní funkcí této bílkoviny je zajistit pohyb virionů v hostitelských buňkách z buňky do buňky (Deom *et al.*, 1987). Pohybové proteiny jsou také zodpovědné za kompartmentaci virové RNA v cytosolu (Más & Beachy, 1999). Ve fyziologických podmínkách se průměrná velikost vnitřního plasmodesmatického kanálu pohybuje mezi 2,5–3 nm (Ding *et al.*, 1992). Některé viry, virus tabákové mozaiky nevyjímaje, jsou schopny pomocí svých pohybových proteinů kooperovat s plasmodesmaty a zvětšovat jejich průměr až na 6 nm. Díky tomu může docházet k rychlejšímu a masivnějšímu toku virionů z buňky do buňky (Citovsky *et al.*, 1990).

2.2.1.2 Kapsidový protein (CP)

Kapsidový protein (CP, 17kDa) je v hostitelské buňce tvořen translací subgenomové RNA o velikosti cca 700bp. Hlavní opěrnou a funkční kostru tvoří struktura čtyř antiparalelních α – helixů, jejichž C a N konce směřují ven z formované struktury disku. Část podjednotky kapsidového proteinu, orientována do vnitřní strany kanálu, obsahuje vazebné místo pro virovou RNA (Namba *et al.*, 1989; Stubbs, 1999; Klokkenburg *et al.*, 2006). Při vzniku částice se na tři nukleotidy váže vždy jedna podjednotka CP (Stubbs *et al.*, 1977). Struktura podjednotek kapsidového proteinu je uvedena na Obrázku 3.

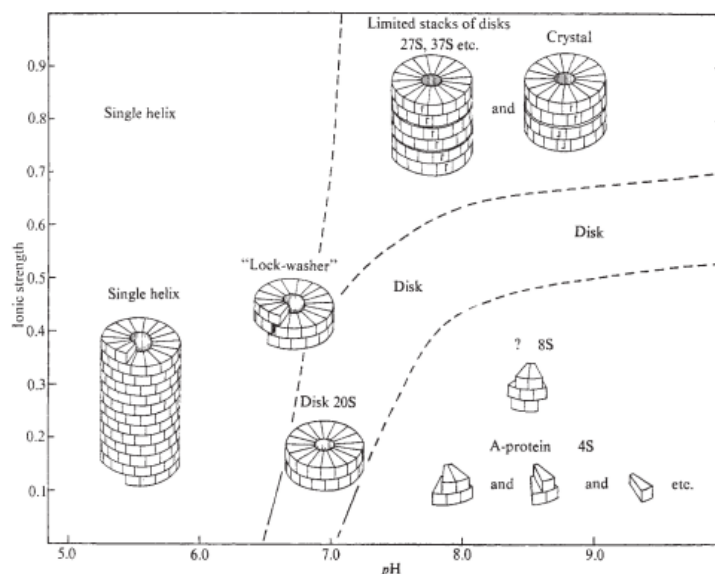


Obrázek 3: Struktura tří podjednotek kapsidového proteinu TMV, (převzato a upraveno z: Shaw *et al.*, 1999)

2.2.1.3 Struktura a tvorba stavebních podjednotek virového kapsidového proteinu

Kapsidové proteiny (TMV-CP) existují v laboratorním *in vitro* prostředí v různých stavech, tzv. agregátech. Experimenty byla potvrzena existence tří základních agregátových struktur: tyčinek, 20S disků a tzv. malých agregátů. Tyčinky odpovídají svou strukturou přirozeně se vyskytujícím infekčním virovým částicím. Dále se tvoří dvouvrstevné diskové struktury (20S disky) a malé agregáty A–proteinu, které se shlukují do mono-, di- nebo trimerů (Durham *et al.*, 1971; *Durham *et al.*, 1971). Jednotlivé agregátové struktury se vyskytují v různém množství a zastoupení, v závislosti na podmínkách prostředí (pH, iontová síla, teplota, viz obrázek 4).

Shlukování a existence různých CP agregátových struktur je velkou měrou závislá na pH prostředí. Se vzrůstajícím pH (pH=7–10) se zvyšuje i poměr výskytu monomerů, dimerů či trimerů A–proteinu oproti jiným strukturám. Neutrální pH (kolem hodnoty pH=7), které se blíží běžnému fyziologickému prostředí v živých buňkách, je ideálním prostředím pro vznik 20S diskových agregátů. Čím více klesá hodnota pH, tím větší je pravděpodobnost shlukování disků do větších tyčinkovitých struktur (Durham, 1972; Butler *et al.*, 1972; Butler, 1984; Klug, 1999).



Obrázek 4: Závislost enkapsidace viru tabákové mozaiky na podmínkách pH prostředí, (převzato z: Klug., 1999)

Mezi jednotlivými podjednotkami kapsidových proteinů existují hojné protein–proteinové interakce, které umožňují vznik agregátů a následně i celých virových částic (Caspar & Holmes, 1969). Pro vznik virových částic jsou důležité nejen hodnoty pH a iontové síly působící v prostředí, ale například i reakční teplota a množství vznikajícího kapsidového proteinu. Čím vyšší koncentrace kapsidového proteinu, tím vyšší je pravděpodobnost správného sbalení virové částice. Ideální reakční teplota, která byla stanovena na základě experimentů je 30°C (Matthews, 1966; *Durham *et al.*, 1971).

2.2.1.4 Mechanismus enkapsidace virové RNA

Proces sbalování částice můžeme rozdělit do dvou hlavních částí: iniciace a elongace. Iniciace enkapsidace je specifický proces, při kterém je rozpoznávána sekvence počátku sbalování (OAS, origin of assembly) nacházející se na virové RNA. OAS sekvence interaguje s vazebným místem v kapsidovém proteinu. Jak již bylo zmíněno dříve, vazebné místo pro RNA je orientováno do vnitřní strany kanálu 20S disku. Sekvence OAS se nachází v blízkosti 3' konce virové RNA (1000 nukleotidů proti proudu) a obsahuje vždy nukleotidovou sekvenci AAG AAG UCG (Turner *et al.*, 1988). Počátek sbalování je přibližně 300 nukleotidů dlouhá sekvence, která zaujímá strukturu vlásenky, jež je zodpovědná za správnou interakci mezi RNA a kapsidovým proteinem. Sekvence OAS je unikátní, proto je iniciační reakce enkapsidace vysoce specifická (Okada & Ohno, 1972; Zimmermann, 1977; Klug, 1999). Naproti tomu elongace probíhá jako méně specifický proces, nezávislý na konkrétní sekvenci RNA, která je

enkapsidována (Turner *et al.*, 1989). Připojování helikálních disků na virovou RNA probíhá převážně na 5' konci RNA, která je vtahována do vnitřního kanálu tak, aby oba konce enkapsidované RNA zůstávaly po co nejdelší dobu na jedné straně nově vznikající částice. V momentě, kdy je celá RNA enkapsidována a chráněna kapsidovým proteinem je proces sbalování ukončen. Velikost částice je závislá na délce RNA, která interaguje s kapsidovými proteiny a společně tvoří celý virion. Pseudočástice mohou v některých případech vznikat i bez RNA. Takovéto částice nemají délku závislou na molekule RNA a jejich délka je náhodná. Nemají ani helikální symetrii, jsou složeny z plochých disků (Butler *et al.*, 1972; Butler, 1984; Butler, 1999; Klug, 1999).

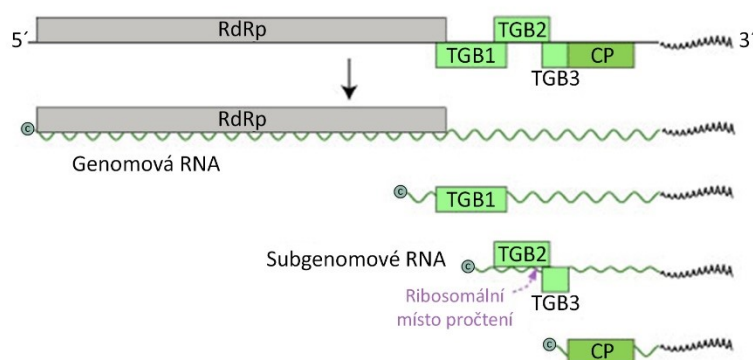
2.3 X virus bramboru (PVX)

2.3.1 Taxonomie viru

X virus bramboru je rostlinný virus, patřící do rodiny *Alphaflexiviridae* a rodu *Potexvirus*. Protože jeho genom tvoří (+) ssRNA, můžeme ho podle Baltimorovy klasifikace zařadit do IV. skupiny, stejně jako virus tabákové mozaiky (King *et al.*, 2011). Virová částice tvoří flexibilní, vláknitou, helikální strukturu, připomínající tyčinku, jejíž délka se pohybuje v rozmezí mezi 470–580 nm. Průměr částice je cca 13 nm. Virus nemá žádný známý vektor a nejčastěji je přenášen mechanicky (Francki *et al.*, 2012).

2.3.2 Genomová informace

Genomová informace viru PVX, viz Obrázek 5, je tvořena (+) ssRNA dlouhou 6435 nukleotidů a členěnou do pěti čtecích rámců (ORFs) (Skryabin *et al.*, 1988). První otevřený čtecí rámec (ORF1) kóduje virovou replikázu. Další tři otevřené čtecí rámce (ORF 2, 3, 4) tvoří tzv. trojitý genový blok (triple gene block), který zaujímá funkci pohybového proteinu. Poslední čtecí rámec kóduje gen pro virový kapsidový protein, jehož hlavní funkcí je ochrana virové RNA, ale je nepostradatelný i při šíření viru z buňky do buňky i pro šíření viru systémem rostliny (Angell *et al.*, 1996; Lough *et al.*, 2000; Tilsner *et al.*, 2012). Na 5' konci je sekvence RNA ohraničena m⁷GpppG čepičkovou strukturou a na 3' konci můžeme nalézt běžnou poly A sekvenci. Replikace viru probíhá v cytoplasmě (Sonnenberg *et al.*, 1978; Morozov *et al.*, 1987).



Obrázek 5: Schéma genomové informace X viru tabáku. Virová RNA dependentní RNA polymeráza je translatována přímo z genomové RNA viru. Ostatní otevřené čtecí rámce jsou transkribovány jako monocistronní subgenomové RNA. Replikace viru probíhá v cytoplasmě (převzato z: viralzone.expasy.org).

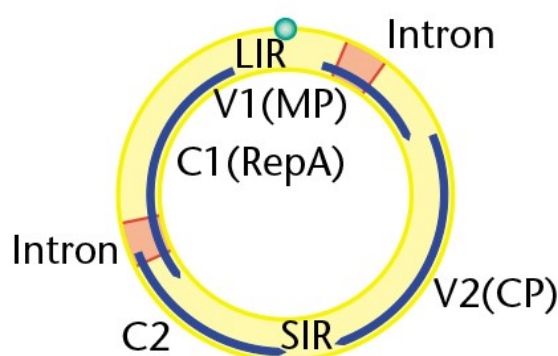
2.4 Virus žluté zakrslosti fazolu (BeYDV)

2.4.1 Taxonomie viru

Virus mozaiky zakrslosti fazolu patří do rodiny *Geminiviridae* a rodu *Mastrevirus*. Podle Baltimorovy klasifikace ho řadíme do II skupiny, mající genomovou informaci kódovanou ssDNA. Každá částice viru obsahuje pouze jednu kruhovou ssDNA molekulu (Murphy *et al.*, 2012).

2.4.2 Genomová informace

Genomová informace je kódována ssDNA, která je uzavřena do specifické struktury virionu, tvořeného dvěma dvacetistěny. Vždy dva dvacetistěny jsou spojeny do jednoho komplexu tvořícího virion cca 38 nm dlouhý a 22 nm široký. Velikost genomu je v rozmezí 2,6–3 kb a je replikován pomocí dsDNA intermediátu v jádře hostitelské buňky. Genom obsahuje specifické intergenové struktury LIR (long intergenic region) a SIR (short intergenic region). LIR sekvence tvoří vlásenku, obsahující konzervovanou sekvenci TAATATTAC, díky které dochází k iniciaci replikace. Naproti tomu SIR sekvence obsahuje obousměrný polyadenylační signál, ukončující replikaci. Transkripce virového genomu je obousměrná, obsahuje 4 otevřené čtecí rámce (2 na virovém a 2 na komplementárním DNA vlákně). Genomová informace viru je zobrazena na Obrázku 6. Virus je replikován pomocí systému valivé kružnice. Pro svou replikaci využívá replikační aparát hostitele (Lazarowitz *et al.*, 1992; Palmer & Rybicki, 1998).



Obrázek 6: Schéma genomové informace viru BeYDV. Virové DNA vlákno je ve schématu značeno V (obsahuje geny pro pohybový a kapsidový protein), komplementární vlákno nese značku C (obsahuje geny pro replikázu). Zeleným kruhovým znakem je pak označena sekvence, zodpovědná za iniciaci replikace, nacházející se v LIR oblasti (převzato z: Stanley *et al.*, 2001).

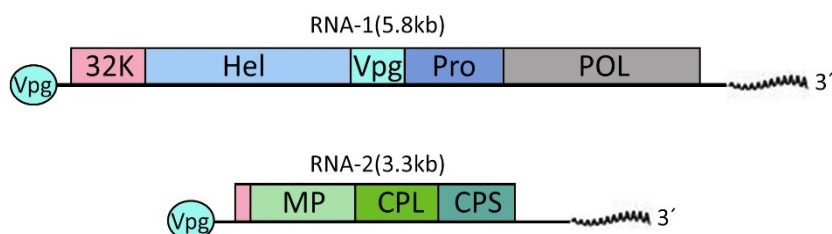
2.5 Virus mozaiky viny (CPMV)

2.5.1 Taxonomie viru

Virus mozaiky viny patří do rodiny *Comoviridae* a rodu *Comovirus*. Stejně jako X virus bramboru a virus tabákové mozaiky patří do IV. skupiny virů podle Baltimorovy klasifikace. Jeho genomová informace je kódována (+) ssRNA (Francki *et al.*, 2012).

2.5.2 Genomová informace

Genom viru mozaiky viny je rozdělen do dvou molekul RNA (RNA1= 5,8kb a RNA 2= 3,3 kb). Jednotlivé molekuly RNA nesou na 3' konci poly A sekvenci a na 5' konci jsou chráněny VPg proteinem (virus genome–linked protein), nahrazujícím funkci čepičky (Gopinath *et al.*, 1999; Nayudu, 2008), viz Obrázek 7. Jednotlivé RNA jsou zvlášť enkapsidovány do samostatných dvacetistenných virionů o průměru cca 30 nm (Hesketh *et al.*, 2017). Kapsida je tvořena dvěma typy kapsidového proteinu, malým kapsidovým proteinem (CPS) a velkým kapsidovým proteinem (CPL). Procesem translace je tvořen polyprotein, který je následně pomocí proteázy štěpen na jednotlivé funkční části. Vektorem viru jsou brouci (Francki *et al.*, 2012).



Obrázek 7: Schéma genomové informace viru CPMV. Genom viru mozaiky viny je rozdělen do dvou částí (RNA-1 a RNA-2). Každá RNA je na 5' konci opatřena VPg proteinem a na 3' konci klasickou poly (A) sekvencí. RNA-1 kóduje helikázu, proteázu a RNA dependentní RNA polymerázu. RNA-2 kóduje pohybový protein a oba typy kapsidového proteinu (převzato z: <https://viralzone.expasy.org>)

2.6 Biotechnologické využití virových částic

Rostlinné viry mají některé zajímavé vlastnosti, které je předurčují k možnému biotechnologickému využití. Jedním směrem je použití viru jako autonomního, samostatně se replikujícího a šířícího se expresního vektoru. Výhody využití viru pro produkci proteinů v rostlinách oproti jiným systémům můžeme hledat např. v nízké kontaminaci výsledného produktu toxiny nebo patogeny (Koprowski *et al.*, 2001) nebo velkém množství syntetizovaného produktu za relativně krátkou dobu (Streatfield *et al.*, 2003). K tomuto účelu jsou nejčastěji používány tobamoviry např. TMV (Gleba *et al.*, 2007; Gleba *et al.*, 2013), potexviry např. PVX (Chapman *et al.*, 1992; Gleba *et al.*, 2007) nebo potyviry např. ZuYMV (virus žluté mozaiky cukety) (Gal-On *et al.*, 1990). Kromě využití schopností viru jako expresního vektoru, se velmi často využívá i vlastností virových kapsidových proteinů a částic. Virové kapsidové proteiny mají velmi často schopnost samostatně polymerovat a organizovat se do virům podobným částic (VLPs). Ty jsou vhodné pro prezentaci epitopů za účelem přípravy vakcín nebo pro různé nanotechnologické aplikace. Díky výborné chemické a fyzikální stabilitě mohou být rostlinné VLPs modifikovány i dodatečně chemicky (Pokorski & Steinmetz, 2011). V poslední době roste zájem o produkci složitějších komplexů – například nukleoproteinových komplexů obsahujících nukleovou kyselinu (RNA, DNA) obalenou ve VLPs částicích, které mohou být dále funkcionalizovány. V této diplomové práci byly použity systémy založené na viru tabákové mozaiky, viru mozaiky vigny a viru žluté zakrslosti fazolu, proto se bude i tato kapitola věnovat hlavně biotechnologickému využití systémů, založených na těchto virech.

2.6.1 Biotechnologické využití viru tabákové mozaiky

Virus tabákové mozaiky má pro biotechnologické využití některé velmi výhodné vlastnosti, jako například jednoduchý genom, stabilní virovou kapsidu se známou 3D strukturou a specifický tyčinkovitý tvar s vnitřní dutinou. K možnému využití viru v biotechnologických aplikacích nemalou měrou přispívá fakt, že je velmi dobře popsán jak jeho infekční cyklus, tak vznik virové kapsidy, její dobře objasněné složení, a proces enkapsidace virové RNA. Jedním z možných využití viru tabákové mozaiky, jemuž byla věnována velká pozornost je tvorba magnetických nanočástic, obsahujících v dutině svého kanálu nebo na povrchu kapsidy atomy kovů. Bylo vytvořeno a popsáno množství částic, obsahující různé atomy kovů, nejčastěji však zlata, platiny, paladia a stříbra (Knez *et al.*, 2003; Dujardin *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006; Knez *et al.*, 2006). Vzniklé magnetické částice, odvozené od viru tabákové mozaiky by moly být

v budoucnu využity pro výrobu nanostrukturovaných elektronických zařízení (Tseng *et al.*, 2006) nebo pro neinvazivní detekci nádorů (Huang *et al.*, 2006). Na podobném principu byl také vyvinut systém pro transport a vnášení chemoterapeutických léčiv, využívající nanočástice založené na viru tabákové mozaiky, obsahující paladium a látku Phenanthriplatin, nadějnou pro nádorovou terapii (Czapar *et al.*, 2016). Virus tabákové mozaiky je také podroben velkému experimentálnímu zkoumání v oblasti agrobiologie. V současné době jsou prováděny experimenty, ve kterých je produkována dsRNA, sloužící k ošetřování rostlin a spuštění RNA interference, která by měla vést k účinné ochraně rostlin proti některým patogenům (Niehl *et al.*, 2018).

2.6.2 Biotechnologické využití viru žluté zakrslosti fazolu (BeYDV)

V poslední době došlo k velkému obnovení zájmu o vektory založené na ssDNA geminivirech, zejména díky jejich potenciálu pro genovou editaci a homologní rekombinaci (Baltes *et al.*, 2014; Čermák *et al.*, 2015). Původně byly tyto expresní vektory určeny pro silnou proteinovou expresi. Populární se staly například vektory odvozené od viru BeYDV, používané pro tvorbu antigenů, monoklonálních protilátek nebo jiných proteinů v rostlinách (Regnard *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Byly vyvinuty systémy, které jsou schopny produkovat velké množství VLPs (virus-like-particle) částic a také jsou schopny produkce vakcín v rostlinách v poměrně krátkém čase (Huang *et al.*, 2010). Výhodou viru BeYDV oproti jiným rostlinným virům je jejich cirkulární DNA genom. Replikon odvozený od viru BeYDV byl například nedávno použit pro tvorbu pseudovirionů lidského papilomaviru (HPV) v rostlinách (Lamprecht *et al.*, 2016). Další výhodou geminivirových vektorů je jejich široký hostitelský okruh. Stejný vektor lze použít v mnoha druzích rostlin. Nelze opomenout ani skutečnost, že se na rozdíl od většiny RNA virů, může v jádře buňky snadno replikovat několik různých vektorů, odvozených od stejného geminiviru. Lze je tedy použít i pro simultánní expresi vícesložkových proteinových komplexů, jako jsou například protilátky IgG nebo s IgA. Nevýhodou těchto vektorů je, že zatím nebyl nalezen způsob, jak těmto vektorům umožnit pohyb v rostlinných pletivech.

2.6.3 Biotechnologické využití viru mozaiky vigny (CPMV)

Virový expresní systém založený na viru mozaiky vigny má některé podobné vlastnosti jako geminivirové systémy. Je to schopnost paralelně exprimovat několik různých proteinů v jediné buňce a neschopnost samostatného pohybu mezi buňkami. Nejde však o klasický virový vektor, který se v rostlinné buňce replikuje, ale o využití vlastností 5' a 3'NTR sekvencí z RNA 2 viru mozaiky vigny. RNA s těmito konci je v cytoplasmě mimořádně stabilní (dle našich

experimentů dochází k translaci nových proteinů až 20 dní po infiltraci). Navíc mají virové NTR oblasti schopnost silně vázat ribozómy, takže by měla nastat poměrně značná exprese vybraného proteinu dle sekvence RNA. Vzhledem k tomu, že není třeba nejprve nastartovat virovou replikaci, jsou vektory založené na CPMV (řada vektorů pEAQ) schopny poměrně rychlého nástupu exprese proteinu, např. GFP lze pozorovat v rostlinách již po 24 hodinách od infiltrace.

Hlavní roli v rapidním nárůstu možného využití CPMV expresních systémů hrálo vytvoření vektorů, které mohou být infiltrovány do rostlin pomocí agroinfiltrace, což výrazně zjednodušuje a usnadňuje proces genové exprese v rostlinách (Liu & Lomonossoff, 2002). Takové vektory byly vytvořeny i pro systémy založené na viru BeYDV (Regnard *et al.*, 2010).

2.7 Tvorba genových konstruktů

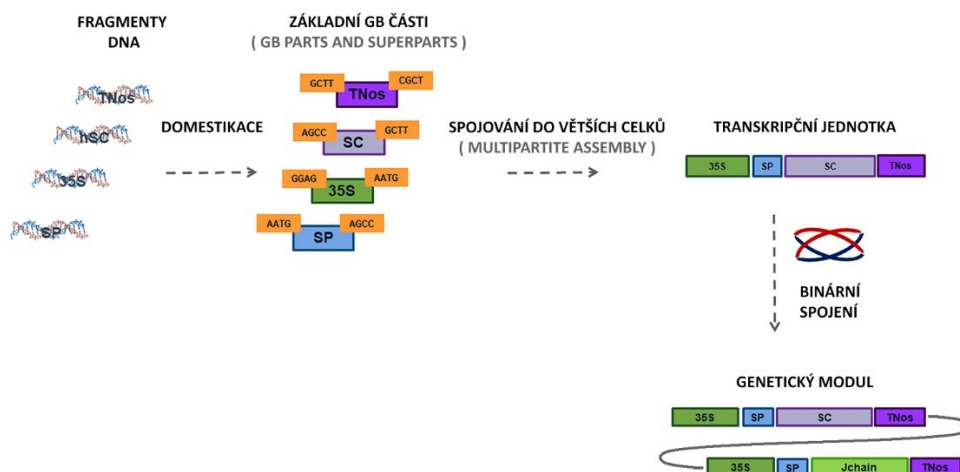
2.7.1 Metoda GoldenBraid

GoldenBraid je moderní a efektivní klonovací systém, založený na modulární konstrukční strategii. Slouží jako účinný nástroj při konstrukci multigenních DNA struktur v mnohých aplikacích syntetické biologie (www.gbcloning.upv.es; Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013). Použitá metoda GoldenBraid je odvozena ze staršího systému GoldenGate. Obě tyto metody využívají pro tvorbu genových konstruktů standardizovaných, vzájemně zaměnitelných stavebních částí (kazet), tzv. „GB parts“ (Engler *et al.*, 2008). Tyto části jsou následně spojeny do tzv. transkripční jednotky (genu), spojováním transkripčních jednotek vznikají vyšší jednotky tzv. moduly. Všechny části mají standardizované konce, takže se dají libovolně skládat do složitějších a komplexnějších celků (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2011).

Velký potenciál nabízí GoldenBraid ve snadné zaměnitelnosti jednotlivých dílů mezi sebou a možnosti jejich sdílení mezi vědeckými laboratořemi kdekoli na světě. Tento potenciál však může být využit pouze při zachování základních pravidel tvorby jednotlivých kazet („GB parts“). Sekvenční informace jednotlivých kazet GoldenBraid kolekce je uložena v internetové GB databázi, což umožňuje snadný přístup a výrazné zjednodušení při plánování experimentů (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013).

2.7.2 Mechanismus tvorby GoldenBraid konstruktů

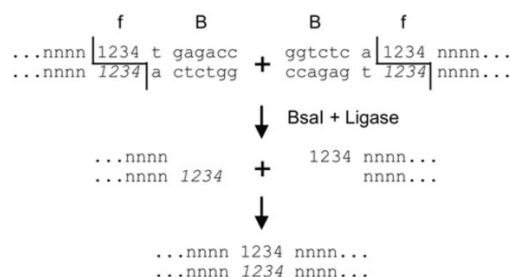
Metoda GoldenBraid je závislá na využití restrikčních enzymů IIS typu. Tyto enzymy generují pseudonáhodné čtyřnukleotidové kohezní konce, které se vyskytují na každém segmentu DNA, který má být v budoucnu využit jako samostatná kazeta. Sekvence kohezních konců je definována GoldenBraid/GoldenGate konvencí. V průběhu domestikace jsou nejprve z DNA fragmentů odstraněna vnitřní místa enzymů BsmBI a BsaI a na konce přidány přesahy s restrikčními místy a patřičnými 4bp konvenčními přesahy. PCR fragmenty jsou poté v restrikčně-ligační reakci pomocí enzymu T4 ligázy a restrikťázy BsmBI vloženy do univerzálního vstupního plazmidu pUPD1 nebo pUPD2. pUPD plazmidy se zaklonovanými částmi „GB parts“ jsou následně spojovány do větších celků: transkripčních jednotek, genů. Tyto celky jsou klonovány do dalšího typu plazmidu (pDGB). pDGB jsou binární plazmidy s *kanamycinovou* nebo *spectinomycinovou* rezistencí. Vzniká transkripční jednotka, která obvykle obsahuje promotor, kódující oblast genu a terminátor ukončující transkripci (Sarrion – Perdigones *et al.*, 2011). Výše popsáný mechanismus je zobrazen na Obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma mechanismu GoldenBraid metody, (převzato z: www.gbcloning.upv.es/documents/)

2.7.3 Domestikace a tvorba základních GB částí („GB parts“)

Prvním krokem při klonování metodou GoldenBraid je tvorba tzv. „GB parts“, samostatných nejzákladnějších podjednotek celého systému. Mechanismus jejich tvorby je uveden na Obrázku 9. Jsou to, jak již bylo zmíněno výše, DNA fragmenty ohraničené čtyřnukleotidovými přesahy, které jsou po vytvoření vloženy do speciálních univerzálních vstupních vektorů (pUPD) (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013). Tato reakce obvykle zahrnuje PCR amplifikaci cílové DNA pomocí primerů, upravených pro GoldenBraid a následné klonování PCR fragmentu do pUPD vektoru restrikčně-ligační reakcí. Předem definované přesahy jsou tvořeny speciálním typem restrikčních enzymů IIs typu (Engler *et al.*, 2008; Engler *et al.*, 2009). Domestikační reakce může zahrnovat nejen přidání hraničních míst (BsaI), ale také odstranění interních restrikčních míst pro různé typy IIs restrikčních enzymů (BsaI, BsmBI nebo BtgZ). Odstranění vnitřních míst velmi účinně zpřesňuje a zrychluje vícekomponentové skládání větších konstruktů (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013; Sarrion-Perdigones *et al.*, 2014).



Obrázek 9: Mechanismus tvorby GB částí pomocí IIS enzymů, (f) – 4 nukleotidová sekvence na konci DNA fragmentů, (B) – BsaI rozpoznávací sekvence (převzato a upraveno z: Engler *et al.*, 2009).

2.7.4 Klonování do cílového plazmidu a vznik transkripční jednotky

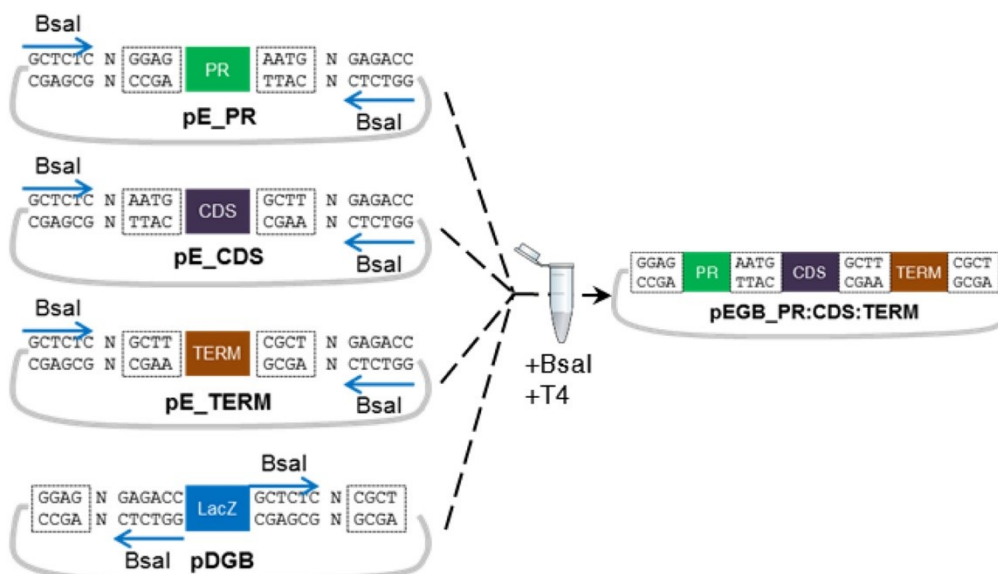
Cílové vektory GoldenBraid (pDGB) jsou binární plazmidy, sloužící jako příjemci nových sestav. Speciální orientaci a uspořádání jednotlivých míst pro restrikční enzymy definují dvě úrovně pDGB: α -plazmid (BsaI restrikční enzym) a Ω -plazmid (BsmBI restrikční enzym). Nejmenší nutný počet cílových pDGB plazmidů pro klonování jsou čtyři (pDGB α 1, pDGB α 2, pDGB Ω 1, pDGB Ω 2). Systém založený na těchto čtyřech plazmidech umožňuje sestavit konstrukty s teoreticky neomezeným počtem prvků s pomocí neomezeného počtu interakcí. Plazmidy nesou různé restrikční markery. α -plazmidy obsahují gen resistance pro kanamycin a Ω -plazmidy pro spektinomycin. Rozdílné resistance markery umožňují a zjednodušují průběžnou selekci plazmidů (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013).

Vytvořené části, „GB parts“, jsou následně klonovány do vektorů α -úrovně pro sestavení funkční transkripční jednotky (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2014). Transkripční jednotka musí vždy obsahovat promotor, sekvenci genu našeho zájmu a terminátor. Plazmidy s GB základními částmi jsou v jednom reakčním prostoru smíchány s odpovídajícím typem IIS restrikčního enzymu a T4 ligázou. Po inkubaci v cyklických restrikčně-ligačních reakcích vzniká tzv. expresní vektor. pDGB plazmidy, používané v metodě GB, jsou binární vektory, proto je výsledný klon přímo připraven pro transformaci do rostlin za použití *Agrobacterium tumefaciens*. Jediné limity, které omezují tvorbu multigenních konstruktů jsou stabilita daného konstruktů v bakteriích *Escherichia coli* nebo *Agrobacterium tumefaciens* (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013).

Jakákoli transkripční jednotka klonovaná do α -plazmidu může být následně zaklonována také do Ω -plazmidu. Pro začlenění dvou transkripčních jednotek do Ω -plazmidu je nutné správně zvolit lepivé konce, musí být vždy vzájemně kompatibilní (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2014).

Schéma multipartitního uspořádání jednotlivých základních částí a tvorba transkripční jednotky jsou pro zjednodušení zobrazeny na Obrázku 10.

Pro využití potenciálu vytvořených několikagenových konstruktů je nutná transformace rostlinných buněk pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (byly použity bakteriální buňky typu GV3101) (Mateusz *et al.*, 2006). Rostliny byly infiltrovány pomocí metody agroinfiltrace.



Obrázek 10: Schéma multipartitního uspořádání „GB parts“ do α plazmidu a tvorba tzv. transkripční jednotky. (převzato z: Sarrion-Perdigones *et al.*, 2014)

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Rostlinný materiál

Pro laboratorní experimenty byly použity rostliny *Nicotiana benthamiana* dvou genotypů:

- *Nicotiana benthamiana*-MP-3H-transgenní typ *Nicotiana benthamiana*-WT, obsahující gen pro pohybový protein (MP) viru tabákové mozaiky (pro potřeby laboratoře poskytnuto Dr. R. N. Beachym, Donald Danforth Plant Science Center, USA).
- *Nicotiana benthamiana*-WT-netransgenní nativní rostlina (pro potřeby laboratoře poskytl Dr. Fischer, Katedra experimentální biologie rostlin, PřF UK, ČR).

Všechny experimenty diplomové práce byly provedeny na rostlinách pěstovaných v růstové komoře s dlouhodobým cyklem (16 hodin světlo/8 hodin tma). Komoř byla plně klimatizována a teplota byla standardně udržována na 24 °C. Všechny rostliny byly pěstovány v substrátu obsahujícím 3 složky: komerční substrát RKS II (AGRO CS a. s.), perlit (PERLIT, spol. s.r.o.) a jemný písek v poměru 3:2:1.

3.1.2 Bakteriální kmeny a viry

Byly použity bakteriální kmeny:

1) *Escherichia coli*:

- *Escherichia coli* TOP10
Genotyp: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG* (Invitrogen, USA)
- *Escherichia coli* DH5α
Genotyp: F- Φ80*lacZ*ΔM15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r_k⁻, m_k⁺*) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻* (Invitrogen, USA)

2) *Agrobacterium tumefaciens*

- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (John Innes Centre, UK)

3) Virus tabákové mozaiky (TMV)

- Byl použit infekční klon viru tabákové mozaiky TMV-U1.
Virus byl poskytnut Dr. R. N. Beachym (Donald Danforth Plant Science Center, USA).
Verzi vhodnou pro agroinfiltraci vytvořil dr. T. Moravec.

4) Virus bramboru X (PVX)

- Virus poskytl Dr. D. Baulcombe (John Innes Centre, UK).

5) Virus mozaiky vigny (CPMV)

- V práci byly využity 5' a 3'NTR sekvence viru mozaiky vigny, které poskytl Dr. G. Lomonossoff (John Innes Centre, UK).

3.1.3 Kompetentní bakteriální buňky

Použité chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* Top10 DH5α a chemicky kompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, byly vytvořeny za pomoci Ing. Jitky Svobodové (Laborař virologie, ŰEB AVČR, ČR). Byly uchovávány pro další použití zmrazené při teplotě -78 °C.

3.1.4 Kultivační a infiltrační média

Pro bakteriální kultivaci bylo využito LB (Luria–Bertani) médium:

- **Tekuté LB médium**
Složení: 1% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl, dH₂O
- **LB médium s agarosou**
Složení: 1% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl, 1,6% (w/v) agar, dH₂O

Do připravených kultivačních médií bylo, ve většině případů, přidáno vybrané selekční antibiotikum, zvolené podle genu resistance, kódovaného v příslušném plazmidu. Média byla skladována v lednici, v rozmezí teplot 4–5 °C.

Pro agroinfiltraci bakteriálních buněk do experimentálních rostlin bylo využito infiltrační médium:

- **Infiltrační médium**
Složení: 10mM MES, 10mM MgCl₂, 100μM acetosyringon, dH₂O

Infiltrační médium bylo vždy připravováno čerstvé.

3.1.5 Antibiotika

Pro specifickou selekci bakteriálních buněk, obsahujících různé druhy plazmidů, byla použita antibiotika. Specifické koncentrace v roztoku a jejich hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Koncentrace zásobních a pracovních roztoků antibiotik.

Antibiotikum	Koncentrace zásobního roztoku	Koncentrace pracovního roztoku
<i>ampicillin</i>	100 mg/ml	100 mg/ml
<i>chloramphenicol</i>	25 mg/ml (v etanolu)	25 mg/ml (v etanolu)
<i>kanamycin</i>	50 mg/ml	50 mg/ml
<i>spectinomycin</i>	50 mg/ml	50 mg/ml
<i>rifampicin</i>	50 mg/ml	50 mg/ml

Navážka antibiotik byla rozpouštěna ve sterilní vodě s výjimkou *chloramphenicolu*. Toto antibiotikum bylo rozpouštěno v příslušném množství ethanolu. Připravený zásobní roztok antibiotik byl sterilně přefiltrován do několika alikvotů a uchováván v mrazáku při -20 °C pro další použití.

3.1.6 Pufry

- **Potahovací pufr**

Použit pro obohacení vzorku virem, tím i virovou RNA před reversní transkripcí.

Složení: 14,7mM Na₂CO₃, 34,8mM NaHCO₃, 3,1mM NaN₃, pH 9,6

- **PBS+Tween**

Složení: 137mM NaCl, 7,8mM Na₂HPO₄.12 H₂O, 1,5mM KH₂PO₄,

2,7mM KCl, 3,1mM NaN₃, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,4

- **TBE**

Elektroforetický pufr pro horizontální agarosovou elektroforézu a tvorbu gelů.

Složení: 89mM Tris-HCl, 89mM H₃BO₃, 2,5mM EDTA, pH 8,0

- **10x SDS**

Pufr používaný při SDS-PAGE jako součást elektroforetického pufru.

Složení: 0,25M Tris báze, 3,5mM SDS, 1,92M glycin (C₂H₅NO₂), dH₂O, pH 8,3

- **Transferový blotovací pufr**

Pufr využitý při skládání a provozu aparatury pro western blot.

Složení: 25mM Tris, 188mM glycin, 20% (v/v) methanol

- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE**

Složení: 62,7mM Tris-HCl, 69,3mM SDS, 0,64M 2-mercaptoethanol, 0,3M sacharosa, 0,03M bromfenolová modř

Pufr využívaný pro tvorbu vzorků, použitých pro metodu SDS-PAGE.

- **Pufry pro přípravu gelů na SDS-PAGE**

- **Pufr 1:** 1,5M Tris-HCl, pH 8,8

- **Pufr 2:** 0,5M Tris-HCl, pH 6,

3.1.7 Barvicí roztoky

Pro barvení elektroforetických gelů byl použit roztok:

- **Coomassie Brilliant Blue (CBB)**

Složení: 0,1% Coomassie Brilliant Blue (Fluka), 50% metanol, 10% ledová kyselina octová, dH₂O

Membrány, použité v metodě Western blot byly barveny:

- **SIGMAFAST™ BCIP®/NBT** (Sigma-Aldrich, USA) – komerční tablety pro barvení membrán

3.1.8 Komerční soupravy

- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific, USA)
- ImmunoStrip® (Agdia, USA)

3.1.9 Enzymy a příslušné pufry

- Dream Taq DNA polymeráza (5 U/μl) (Thermo scientific, USA)
- Dream Taq10x green buffer (Thermo scientific, USA)
- M-MLV RT RNase H Minus, Point Mutant (200 U/μl) (Promega, USA)
- M-MLV pufr 5x (Promega, USA)
- RNAsin (Promega, USA)
- T4 ligáza (Thermo Scientific, USA)
- T4 ligáza 10x pufr (Thermo Scientific, USA)

Restrikční enzymy:

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| ○ BsaI (Thermo Scientific, USA) | ○ PstI (Jena Bioscience, Německo) |
| ○ BsmBI (Thermo Scientific, USA) | ○ EcoRI (New England Biolabs, USA) |
| ○ BamHI (Promega, USA) | ○ HindIII (New England Biolabs, USA) |
| ○ EcoRV (Jena Bioscience, Německo) | |

3.1.10 Protilátky

- Primární protilátky
 - Anti-TMV polyklonální protilátka králíčí (Agdia, USA)
 - Anti-PVX polyklonální protilátka králíčí (Agdia, USA)
- Sekundární protilátky
 - Kozí protilátka proti králíčím imunoglobulinům, konjugovaná s alkalickou fosfatázou (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.11 Primery

V Tabulce 2 jsou uvedeny všechny primery, které byly použity pro PCR reakci a RT (reverzní transkripce).

Tabulka 2: Použité primery

Primer	Sekvence
#1 F	AAATACCATGGAACCTACAGAAGAAGTC
#4 R	AAATGGTACCTGGGCCCCCTACCGGGGG
Act s	CCGTGGGCACCACTAACTAA
Act as	TCACAGACGAGTGGCTGAAT
p-EAQ R	CACAGAAAACCGCTCACC
dsRED 5	GTTCTTCCATGCGAACCTT
RB7 MAR 5	GGTTCGAATTTGTTTACTC

3.1.12 Molekulové markery

V diplomové práci byly použity tyto DNA molekulové markery:

- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)
- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, USA)

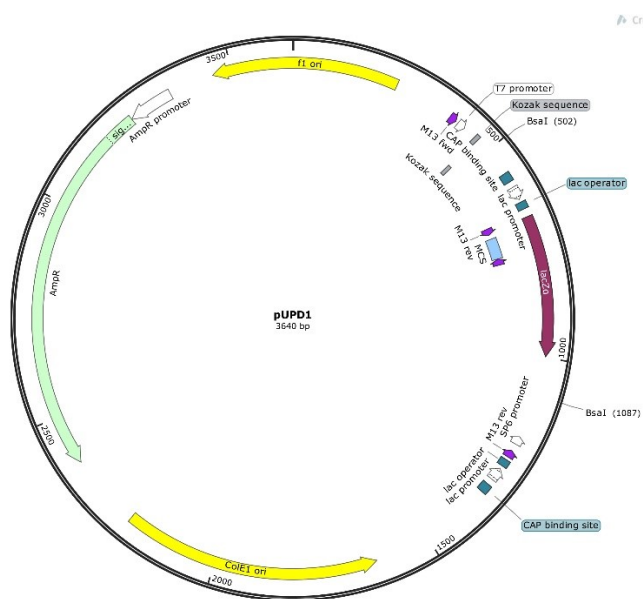
3.1.13 Výchozí plazmidy pro přípravu konstruktů

Pro tvorbu tzv. „GB parts“ bylo třeba, pomocí domestikační reakce, zaklonovat vybrané DNA fragmenty do universálních vstupních domestikačních vektorů. Základní výčet a rozdíly mezi domestikačními plazmidy pUPD, nově používaným plazmidem pUPD2 (oba z konvence

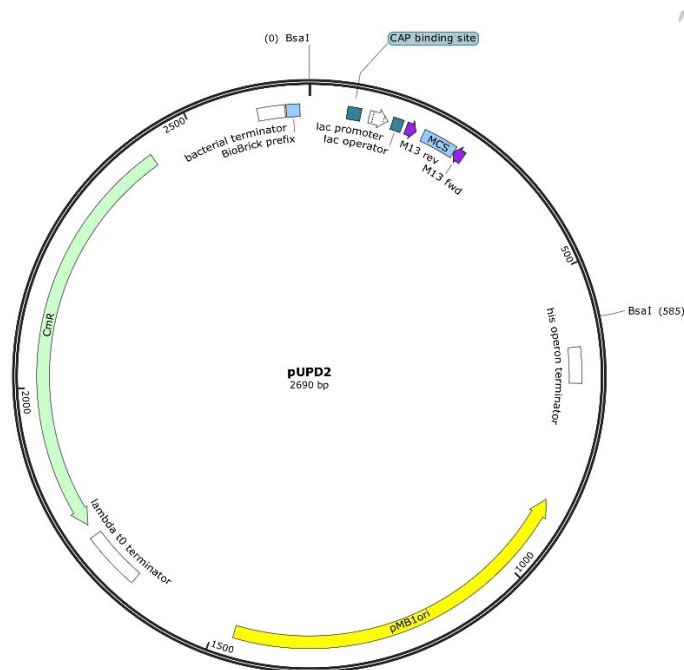
GoldenBraid) a pICH plazmidem, vycházejícím z konvence MocClo (Engler *et al.*, 2014), jsou přehledně popsány v následující tabulce (Tabulka 3) a v genových mapách plazmidů (Obrázek 11, 12).

Tabulka 3: Rozdíly v typech univerzálních domestikačních plazmidů, používaných pro klonování základních standardizovaných částí v konvenci GoldenBraid a analogické konvenci MoClo. (Upraveno z: www.gbcloning.upv.es/pUPD/).

Název plazmidu	pUPD1	pUPD2	pICH
Kostra	pGEMT	pSB1C3	pICH
Resistance	<i>ampicillin</i>	<i>chloramphenicol</i>	<i>spectinomycin</i>
5' klonovací místo	CTCG	CTCG	pro každý inzert jiné
3' klonovací místo	CGAG	TGAG	pro každý inzert jiné
Velikost plazmidu (bp)	3640	2690	2763



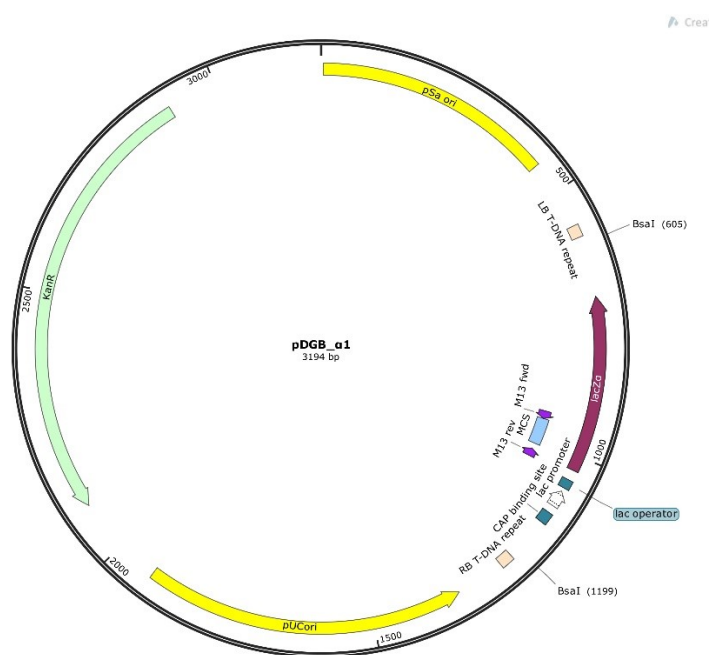
Obrázek 11: Mapa *pUPD1* plazmidu – základního domestikačního plazmidu metody GoldenBraid s vyznačenými restrikčními místy pro enzym BsaI, (vytvořeno pomocí aplikace Snap Gene)



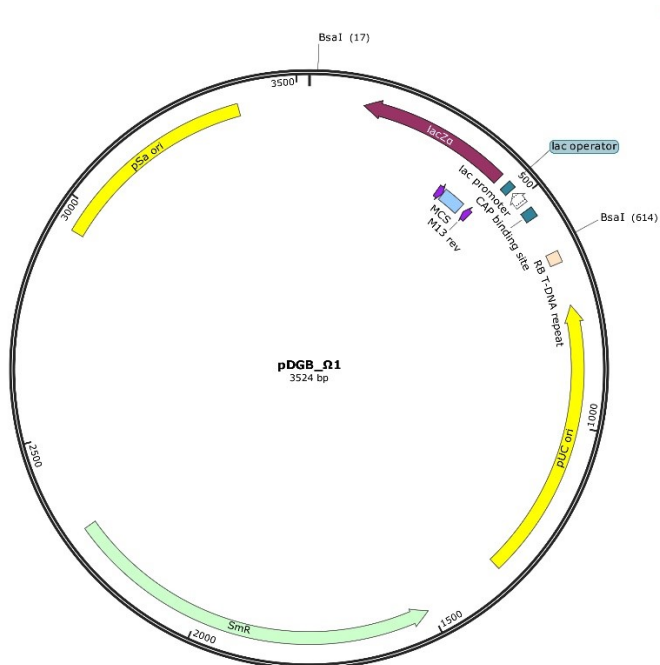
Obrázek 12: Mapa *pUPD2* plazmidu-základního domestikačního plazmidu metody GoldenBraid s vyznačenými restrikčními místy pro enzym BsaI, (vytvořeno pomocí aplikace Snap Gene)

Pro následné klonování základních částí do větších celků byly využity destinační vektory pDGB (pDB1 α 1, 2, 11, 12, 13, 14, pDB1 Ω 1, 2). Všechny destinační vektory, použité v této práci, jsou přehledně popsány v tabulce (Tabulka 4) a na vybraných přiložených mapách plazmidů (Obrázek 13, 14).

Plazmidy pDGB jsou binární vektory, obsahující speciální klonovací strukturu tzv. GB kazetu, která v sobě nese gen *LacZ*, díky němuž mají tyto plazmidy schopnost modrobílé selekce pomocí substrátu X-gal. GB kazeta, obsažená v plazmidu je ohraničena rozpoznávacími místy restrikčních enzymů typu IIS (BsmBI a BsaI). Během restrikčně – ligační GB reakce je část plazmidu, obsahující gen pro β -galaktosidázu vyštěpena a nahrazena novou, tzv. kazetou, obsahující gen nebo geny našeho zájmu. Čísla a písmena řecké abecedy v názvu plazmidů, slouží k rozpoznání cílového plazmidu dle přilehlých přesahů, vytvořených IIS enzymy. (Převzato z: https://gbcloning.upv.es/files/documents/GB2.0_Users_manual.pdf).



Obrázek 13: Mapa *pDGB α 1* plazmidu – destinačního vektoru metody GoldenBraid s vyznačenými restrikčními místy pro enzym BsaI, (vytvořeno pomocí aplikace Snap Gene)



Obrázek 14: Mapa *pDGB Ω 1* plazmidu – destinačního vektoru metody GoldenBraid s vyznačenými restrikčními místy pro enzym BsmBI, (vytvořeno pomocí aplikace SnapGene)

Tabulka 4: Bližší popis všech používaných základních destinačních vektorů, které se vyskytují v konvenci GoldenBraid, pro tvorbu větších konstruktů, obsahujících několik klonovaných částí.

Název plazmidu	pDB1 α 1, 11, 12, 13, 13R 14, 2, 2R	pDB3 Ω 1, 2
Kostra	pGREEN	pCAMBIA
Resistance	<i>kanamycin</i>	<i>spectinomycin</i>
Klonovací místa	GGAG, CGCT	GGAG, CGCT
Velikost plazmidu (bp)	3195	6800

3.2 Metody

3.2.1 Tvorba genových konstruktů pomocí metody GoldenBraid

Na počátku tvorby jednotlivých GB částí bylo třeba vyhledat nukleotidovou sekvenci a uložit ji jako Fasta soubor. Tento soubor byl vložen do programu GB Cloning Domesticator, přístupném na internetových stránkách gbccloning.upv.es/do/domestication/.

Program provedl kontrolu přítomnosti interních míst pro nasedání restrikčních enzymů, určil primery a podmínky restrikčně–ligační reakce.

Následná PCR reakce byla nastavena podle doporučených podmínek s využitím vybraných primerů. Každá reakce probíhala v objemu 50 µl v mikrozkuvkách.

Správnost amplifikované DNA byla ověřena horizontální elektroforézou na agarosovém gelu (metoda popsána v kapitole 3.2.3.6).

Přečištěný produkt PCR reakce byl smísen s některým z universálních domestikačních plazmidů (pUPD, pUPD₂), T4 DNA ligázou (Thermo Scientific, USA), a T4 10x DNA ligačním pufrům (Thermo Scientific, USA). Obecný popis reakční směsi a podmínek restrikčně–ligační reakce je uveden v Tabulce 5 a 6.

Tabulka 5: Obecný popis reakční směsi pro restrikčně/ligační reakci.

Složka	jednotka	objem
DNA	ng	80 ng od každého plazmidu, 40 ng PCR fragmentu
Pufr 10x T4 ligázy	µl	1
T4 ligáza	µl	1
BsmBI	µl	0,5
ddH ₂ O	µl	doplnění do 10

Tabulka 6: Obecné podmínky restrikčně/ligační reakce.

Krok restrikčně/ligační reakce	teplota (°C)	čas (minuta)	počet cyklů
Počáteční fáze reakce	37	10	1
Restrikčně–ligační reakce	37	2	45
	16	5	
Konečná fáze reakce	37	30	1
Deaktivace enzymů	80	20	1

Reakce probíhala v 10 µl reakční směsi.

Produkt restrikčně–ligační reakce byl transformován do *Escherichia coli* (metoda popsána v kapitole 3.2.2.1). Po inkubaci Petriho misky s nalitým agarem v LB médiu, byly odebrány bílé bakteriální kolonie pro minipreparaci DNA (metoda popsána v kapitole 3.2.3.2).

Z důvodů ověření správnosti transformace do bakteriálních buněk *Escherichia coli* byla provedena restrikční analýza. Pro každý typ plazmidové kostry byly vybírány jiné restrikční enzymy (viz tabulka 7).

Tabulka 7: Vybrané restrikční enzymy, které jsou v rámci restrikční analýzy používány pro štěpení vybraných plazmidů.

Kostra plazmidu	resistence	doporučené enzymy	pufr k vybranému enzymu
pJET	<i>ampicillin /carbenicillin</i>	<i>BglII</i>	CutSmart
pUPD1	<i>ampicillin /carbenicillin</i>	EcoRI (+PstI)	CutSmart
pUPD2	<i>chloramphenicol</i>	EcoRI+ PstI	CutSmart
pDBα1,11,12,13,14	<i>kanamycin</i>	EcoRI	CutSmart
pDBα2	<i>kanamycin</i>	HindIII	CutSmart
pDBΩ1	<i>spectinomycin</i>	BamHI	CutSmart
pDBΩ2	<i>spectinomycin</i>	EcoRV	CutSmart

Kontrolní restrikční reakce probíhala ve 20 µl, při 37 °C, 3 hodiny nebo přes noc. Složky reakce jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8: Obecný popis reakční směsi pro kontrolní restrikční reakci.

Složka reakce	jednotka	objem
Enzym	µl	0,4
Plazmidová DNA	µl	4
Pufr pro daný plazmid	µl	2
ddH ₂ O	µl	13,6
Celkový objem	µl	25

Postup pro tvorbu konstruktů, složených z více GB částí byl shodný s výše uvedeným. Obsahoval stejné reakce, s výjimkou první a poslední. PCR a následné ověřování PCR produktů na horizontálním elektroforetickém gelu neprobíhá a poslední krok, který se u vícekomponentového skládání přidává, je transformace do *Agrobacterium tumefaciens* (metoda popsána v kapitole 3.2.2.2) a následná agroinfiltrace do experimentálních rostlin (popsána v kapitole 3.2.4.2). V Tabulce 9 jsou uvedeny všechny základní části, použité pro tvorbu vícekomponentových plazmidových konstruktů.

Tabulka 9: Používané základní části pro GB klonování

Základní část	Kostra	Resistance	Klonovací místa	Velikost inzertu (bp)	Zdroj	Popis
35SP-CPMV-5'NTR	pUPD1	<i>ampicillin</i>	GGAG, AATG	815	ÚEB AVČR	35S promotor řízovaný s částí 1/2 pEAQ vektoru, odvozeného z viru CPMV
LIR2	pUPD2	<i>chloramphenicol</i>	GGAG, AATG	340	ÚEB AVČR/BRU	obousměrný promotor, dlouhá intergenová oblast BeYDV
35S-TMV-Rep-MP	pUPD2	<i>chloramphenicol</i>	GGAG, AATG	5500	ÚEB AVČR	35S promotor řízovaný s částí infekčního klonu TMV, obsahuje intron v Rep
TMV-CP	pUPD1	<i>ampicillin</i>	AATG, GCTT	600	ÚEB AVČR	kapsidový protein odvozený z viru tabákové mozaiky
PVX-CP	pUPD1	<i>ampicillin</i>	AATG, GCTT	800	ÚEB AVČR	kapsidový protein odvozený z viru bramboru X
TMV-replikáza s intronem	plet pUPD2b	<i>chloramphenicol</i>	AATG, GCTT	4500	ÚEB AVČR	réplikáza z viru TMV, složená ze 4 částí, 3 klonované v plazmidu pJET, 1 část klonovaná v pUPD2b
Rep/RepA	pUPD2	<i>chloramphenicol</i>	AATG, GCTT	1152	ÚEB AVČR/BRU	réplikáza odvozená z viru BeYDV
Timer	pUPD2	<i>chloramphenicol</i>	AATG, GCTT	750	ÚEB AVČR	fluorescenční timer, měnící emisi ze zelené na červenou
TMV-OAS	pUPD1	<i>ampicillin</i>	TTCG, GCTT	80	ÚEB AVČR	TMV enkapsidační počátek, obsahující stop kodon
CPMV-3'NTR+NosT	pUPD1	<i>ampicillin</i>	GCTT, CGCT	530	ÚEB AVČR	2/2 část pEAQ vektoru, odvozeného z CPMV vektoru, obsahuje 3'NTR a Nos terminátor
SIR	pUPD2	<i>chloramphenicol</i>	GCTT, CGCT	193	ÚEB AVČR	krátká intergenová oblast BeYDV
OAS-3'NTR-TMV-Rib-Nos	pUPD2	<i>chloramphenicol</i>	GCTT, CGCT	778	ÚEB AVČR	enkapsidační počátek TMV, obsahující TMV-3'NTR a Nos terminátor
OAS-3'NTR-CPMV-Nos	pUPD2	<i>chloramphenicol</i>	GCTT, CGCT	637	ÚEB AVČR	enkapsidační počátek TMV, obsahující CPMV-3'NTR a Nos terminátor
Rb7-MAR	pUPD1	<i>ampicillin</i>	GGAG, CGCT	1000	ÚEB AVČR	matrix attachment region z tabáku
SF1a	pUPD2	<i>chloramphenicol</i>	GGAG, CGCT	35	ÚEB AVČR	velmi krátký stuffer fragment, dimer primeru
SF2a	pUPD2	<i>chloramphenicol</i>	GGAG, CGCT	55	ÚEB AVČR	velmi krátký stuffer fragment, dimer primeru
Prom-CaMV35SShort 5'NTR-TMV	pICH51277	<i>spectinomycin</i>	GGAG, AATG	450	MoClo	35S promotor z CPMV + 5'NTR z TMV
CDS1-YFP	pICSL8001	<i>spectinomycin</i>	AATG, GCTT	720	MoClo	YFP – žlutý fluorescenční protein
CDS1-GFP	pICH41531	<i>spectinomycin</i>	AATG, GCTT	721	MoClo	GFP – zelený fluorescenční protein
CDS1-dsRED	pICH49477	<i>spectinomycin</i>	AATG, GCTT	679	MoClo	dsRED varianta replikám
CDS1-GUS	pICH75111	<i>spectinomycin</i>	AATG, GCTT	2016	MoClo	β-glucuronidáza (<i>Escherichia coli</i>) se dvěma introny
CDS1-P19	pICH44022	<i>spectinomycin</i>	AATG, GCTT	519	MoClo	P19 suppressor genového umlčování z Tomato Bushy Stunt Virus
3'NTR+Ter-CaMV35S	pICH41414	<i>spectinomycin</i>	GCTT, CGCT	204	MoClo	3'NTR, polyadenylační signál/terminátor a 35s promotor z CPMV
3'NTR+Ter-AtuNos	Pieh41421	<i>spectinomycin</i>	GCTT, CGCT	263	MoClo	3'NTR, polyadenylační signál/terminátor a Nos z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

3.2.2 Práce s bakteriálními kulturami

3.2.2.1 Transformace do *Escherichia coli*

Do mikrozkuřavky bylo přeneseno 5 µl plazmidové DNA a 100 µl kompetentních buněk *Escherichia coli*. Vše bylo jemně a důkladně promíseno a inkubováno v ledu po dobu jedné hodiny. Následně byly mikrozkuřavky přeneseny do termobloku (Biometra TB1 Thermoblok, Analytik Jena AG, Německo), dále v textu pouze termoblok, vyhřátém na teplotu 42 °C. Buňky byly vystaveny teplotnímu šoku po dobu 2 minut a poté ihned přeneseny na led a inkubovány v chladném prostředí 2 minuty. Po uplynutí 2 minut bylo k buněčné suspenzi přidáno 600 µl LB média bez antibiotik o laboratorní teplotě a vše bylo opatrně promíseno. Takto připravené buněčné kultury byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C v inkubátoru s třepáním (Shaking Incubator (NB-205), N-biotek, Korea), dále jen inkubátor s třepáním. Následně byly kultury odstředěny při 4000 g po dobu 2 minut. 500 µl vzniklého supernatantu bylo odsáto a ve zbylých 100 µl média, byla resuspendována bakteriální peleta. Buněčná suspenze byla přenesena na Petriho misku s agarem v LB médiu s příslušným antibiotikem a rozetřeným X – gal substrátem (50µl na jednu Petriho misku (rozetřeno dříve, než bakteriální suspenze). Plotny byly inkubovány při 37 °C přes noc. Pro další práci byly použity pouze vyselektované, bílé, bakteriální kolonie, které bylo možno rozeznat v rámci modrobílé selekce, založené na nefunkčnosti genu *LacZ*, kódujícího enzym β -galaktosidázu.

3.2.2.2 Transformace do *Agrobacteria tumefaciens*

Do mikrozkuřavky byl přenesen 1 µl plazmidové DNA a k této DNA bylo přidáno 100 µl kompetentních buněk *Agrobacteria tumefaciens*. Vše bylo jemně a důkladně promíseno a zmrazeno v tekutém dusíku po dobu 5 minut. Následně byly mikrozkuřavky přeneseny do termobloku, vyhřátém na teplotu 37 °C, dokud nedošlo k rozmrznutí buněčné suspenze (cca 2 - 3 minuty). Ještě jednou bylo provedeno zmrazení buněk v tekutém dusíku a následné rozmrazení při 37°C. Následně byly mikrozkuřavky inkubovány po dobu 5 minut na ledu. K buňkám byl, po uplynutí inkubační doby, přidán 1 ml tekutého LB média a takto připravené buňky byly inkubovány v horizontální poloze v inkubátoru se třepáním při 28 °C po dobu 2 hodin. Následně byly buňky odstředěny v centrifuze (Centrifuga Biofuge Pico, Heraeus, Německo) při 4000 g, 2 minuty. Bylo odpipetováno 900 µl supernatantu a ve zbylých 100 µl média byla resuspendována bakteriální peleta. Bakteriální suspenze byla přenesena na Petriho misku s agarovým gelem v LB médiu, obohaceným příslušným antibiotikem. Petriho miska

byla inkubována při 28 °C v inkubačním boxu (Heraeus B6 incubator, Heraeus, Německo) po dobu dvou dní.

3.2.2.3 Konzervace bakteriálních kultur

Bakteriální buňky byly naočkovány do tekutého LB média s antibiotiky a inkubovány přes noc v inkubátoru s třepáním při 28 °C (*Agrobacterium tumefaciens*), 37 °C (*Escherichia coli*). Následně bylo přeneseno 420 µl narostlé bakteriální kultury do mikrozkušavky a smícháno s 80 µl 50% glycerolu. Obsah mikrozkušavky byl důkladně, ale opatrně promísen špičkou pipety, zmrazen v tekutém dusíku a ihned přenesen do mrazáku. Bakteriální konzervy byly uchovávány při -78 °C v mrazáku.

3.2.3 Metody založené na práci s nukleovou kyselinou

3.2.3.1 Virová izolace a purifikace

Experimentální rostliny *Nicotiana benthamiana* byly mechanicky inokulovány již vytvořeným virovým purifikátem viru TMV-U1, kultivovány a po propuknutí infekce byly jejich listy odebrány a dále zpracovány. Izolace a purifikace namnoženého viru TMV-U1 byla provedena dle následujícího protokolu:

- Nejprve bylo nutné připravit potřebné pufrы:
 - Extrakční pufr: 2,46 g $\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + 12,24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ + 0,5 g kyseliny askorbové ve 100 ml dH_2O , pH 7,2
 - 50x zředěný extrakční pufr
- Odebrané listy *Nicotiana benthamiana*, obsahující virus TMV-U1 jsme nejprve zvážili, následně umístili do třecí misky s tloučkem a za občasného přilévání kapalného dusíku do misky jsme vzorky co nejlépe homogenizovali.
- Následně jsme do misky přidali 1,3 násobek extrakčního pufru a ještě chvíli jsme směs důkladně homogenizovali.
- Výslednou směs jsme přefiltrovali přes plátno a přelili do 50 ml zkumavek a odstředili v centrifuze (Centrifuga Multifuge 3S-R, Heraeus, Germany) při 4600 g, 30 minut, 5 °C.
- Vzniklý supernatant byl opatrně přepipetován do čisté 50 ml zkumavky a smísen s NaCl (aby výsledná koncentrace ve zkumavce byla 3%) a PEG 6000 (aby výsledná koncentrace ve zkumavce byla 5%). Zkumavka byla přes noc umístěna do lednice.

- Poté byla zkumavka se vzorkem znovu přenesena do centrifugy (Centrifuga Multifuge 3S-R, Heraeus, Germany) a odstředěna při 4600g, 20 minut, 5°C.
- Výsledný supernatant byl ze zkumavky odstraněn, peleta byla resuspendována cca ¼ původního objemu 50x zředěným extrakčním pufrům a znovu odstředěna v centrifuze (Centrifuga Multifuge 3S-R, Heraeus, Germany) při 4600 g po dobu 15 minut, 5°C.
- Supernatant byl přenesen do ultracentrifugačních kyvet v objemu 20 ml na sacharosový polštář (20% sacharosa v 50x zředěném extrakčním pufru) a kyvety byly následně co nej přesněji vyváženy.
- Vyvážené kyvety byly odstředěny v ultracentrifuze (Ultracentrifuga Beckman L7-55, rotor Ti50.2, Beckman Coulter, USA) po dobu 3 hodin při 27 000 g, 4°C.
- Po odstředění byl odstraněn supernatant a vzniklá gelová virová peleta byla opatrně omyta od zbylých nečistot a rozpuštěna v 1 ml 50x zředěného extrakčního pufru.
- Koncentrace výsledné RNA viru ve vytvořeném virovém purifikátu byla vypočtena z hodnoty měření při absorbanzi 280 nm ze vzorce:

$$[\text{mg} / \text{ml}] = (\text{ředění } A_{280}) / \text{EK (TMV)}. \text{ Extinkční koeficient TMV} = 3.$$
- Virový purifikát byl uchováván v lednici při 4°C.

3.2.3.2 Minipreparace DNA

Narostlé transformované buňky *Escherichia coli* byly odstředěny při 4 000 g po dobu 10 minut.

Pro minipreparaci byl použit komerční kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA). Pro izolaci plazmidové DNA byl přesně zachován postup, uvedený v návodu výrobce.

3.2.3.3 Měření koncentrace DNA

Pro zjištění přibližné koncentrace DNA nebo RNA byl použit spektrofotometr NanoDrop™ (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). Koncentrace DNA byla měřena ve 2 µl kapkách izolované DNA (RNA) měřením absorbance při vlnové délce 260 (280) nm.

3.2.3.4 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je reakce, během které dochází k přepisu RNA do molekuly cDNA. Katalyzátorem reakce je enzym reverzní transkriptáza (v diplomové práci byla použita M-MLV Reverzní transkriptasa RNase H minus (Promega, USA)). Produktem reverzní transkripce je hybrid RNA–DNA, který je nutné amplifikovat pomocí následné PCR reakce.

V prvním kroku byl vytvořen extrakt z rostlinného materiálu v potahovacím pufru (podle extrakce popsané v kapitole 3.2.5.2 s výměnou PBS pufru za pufr potahovací (složení popsáno v kapitole 3.1.6). Následně bylo 50 μ l tohoto extraktu napipetováno do malých PCR mikrozkušavek a inkubováno jednu hodinu při 37 °C v termobloku. Rostlinný extrakt byl odpipetován a velmi opatrně a pomalu byly mikrozkušavky 3x propláchnuty 50 μ l PBS. Pro důkladné odstranění zbytků PBS bylo nutné nechat mikrozkušavky při 37 °C vyschnout (5–10 minut otevřené v termobloku).

Následně byly do každé reakce přidány tyto komponenty:

- 1 μ l primer
- 10 μ l ddH₂O

Vzorky byly inkubovány v termobloku při 70 °C po dobu 5 minut. Poté byly mikrozkušavky ihned umístěny do ledu na 5 minut a po uplynutí této doby byly na ledu přidávány do reakce další komponenty RT směsi.

Do každé 25 μ l reakce bylo přidáno:

1 μ l M-MLV Reversní transcriptasa RNase H minus (Promega, USA)

5 μ l M-MLV PUFR 5x (Promega, USA)

1,25 μ l dNTP (10 mM) (Thermo Scientific, USA)

0,25 μ l RNAsin/ RiboLock RNase Inhibitor (40 U/ μ l) (Thermo Scientific, USA)

6,5 ddH₂O

Vzorky byly inkubovány v termobloku při 42 °C, 60 minut. Po této době byly přeneseny do termobloku, vyhřátého na 70 °C z důvodů inaktivace enzymu reverzní transkriptázy. Produkt reverzní transkripce bylo možné skladovat při -78 °C v mrazáku.

3.2.3.5 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Obecný předpis pro PCR reakci, používanou pro amplifikaci cDNA fragmentů, vzniklých reverzní transkripcí je uveden v Tabulkách 10 a 11.

Tabulka 10: Obecný předpis pro složení PCR směsi.

Složka reakce	jednotka	objem
Pufr 10x	μl	2,5
dNTP	μl	0,75
Primer R	μl	0,75
Primer F	μl	0,75
DNA templát	μl	1
ddH ₂ O	μl	19,05
Taq polymeráza	μl	0,2
Celkový objem	μl	25

Tabulka 11: Obecné schéma používané PCR reakce.

Fáze PCR	teplota (°C)	čas (sec)	počet opakování
Počáteční denaturace	94	180	1
Denaturace	94	30	30–35
Nasedání primerů	55	30	
Elongace	72	30–45	
Deaktivace enzymů	72	300–600	1

3.2.3.6 Horizontální agarosová gelová elektroforéza

Pro potřeby rozdělení jednotlivých DNA molekul podle jejich velikosti byl v této práci použit 1% a 0,8% agarosový gel. Předpis pro jeho tvorbu je uveden v Tabulkách 12 a 13.

Tabulka 12: Předpis pro tvorbu 1% agarosového gelu.

Složka	jednotka	1% agarosový gel
1x TBE	ml	100
Agarosa	g	1
SYBR TM Safe DNA Gel Stain	μl	10

Tabulka 13: Předpis pro tvorbu 0,8% agarosového gelu.

Složka	jednotka	0,8% agarosový gel
1x TBE	ml	100
Agarosa	g	0,8
GelRed TM Nucleic Acid Gel Stain	μl	2

Do 100 ml TBE byla přidána navážka agarosy (Cambrex, USA), podle typu gelu a tato směs byla po dobu cca 5 minut zahřívána v mikrovlnné troubě, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarosy. Poté bylo do roztoku v kádince, za stálého míchání, přidáno citlivé vazebné barvivo (SYBRTM Safe DNA Gel Stain nebo GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain) a připravený roztok byl nalit do aparatury pro přípravu gelů (BIO-RAD, USA). Pro vytvoření jamek byl do roztoku umístěn hřeben. Po zatuhnutí gelu byl nejdříve opatrně vyndán hřeben a následně byl gel přenesen do elektroforetické vany (BIO-RAD, USA). Do jamek byly nanесeny vzorky z PCR reakce o objemu 10 µl na jamku. Jako molekulový marker byl použit GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA). Celá reakce probíhala v 1xTBE elektroforetickém pufru, při konstantním napětí 100 V (1 V/1 cm²) 30 minut. Gel byl zobrazen a vyfotografován pomocí UV záření v přístroji Molecular Imager® Gel DocTM XR System (Termo Fisher Scientific, USA), za použití Quantity-one softwaru.

3.2.3.7 Sekvence DNA

Vytvořené DNA fragmenty a konstrukty byly ověřeny pomocí sekvenace Sangerovou sekvenační metodou. Vzorky pro sekvenování byly připraveny smísením 5 µl plazmidu (koncentrace 80–100 ng/ µl) a 5 µl příslušného sekvenačního primeru (koncentrace 5 µmol). Primery použité při sekvenování jsou uvedeny v Tabulce 14. Sekvenační reakce byly provedeny společností GATC Biotech AG (Německo). Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu Vector NTI Advance 11, Mgr. Tomášem Moravcem, Ph.D.

Tabulka 14: Použité sekvenační primery

Název primeru	nukleotidová sekvence
pUDP2-R2	GAGGAAGCCTGCATAACG
pUPD2-F2	CCCGATCAACTCGAGTGCCA
dsRED-seq-3	AACCGAGGGACGCCACCA
dsRED-seq-5	GTTCCCTCCATGCGAACCTT
GB-alfaF2	GGGCTTCTGGATTTCGATC
GB-alfaR2	TTTTGCTCACATGAGATCTC
RIC-RepRCA-R	GAGCACTTGGGATAGGTAAG
RIC-35SP-RCA-R	GAGCCACCTTCCTTTTCCAC

3.2.4 Přenos genových konstruktů do experimentálních rostlin

3.2.4.1 Inokulace LB media *Agrobacterium tumefaciens*

Na Petriho misku, obsahující agar v LB médiu s příslušným antibiotikem byla přenesena část bakteriální suspenze z bakteriálních konzerv (popsáno v kapitole 3.2.2.3), v množství přeneseném na konci pipetové špičky. Toto množství bylo rozetřeno na povrchu agarového média a inkubováno při 28 °C přes noc. Vyroslá buněčná kultura byla seškrábnuta z Petriho misky špičkou pipety a přenesena do tekutého LB média s antibiotiky. Transformované buňky *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) byly ponechány růst přes noc v inkubátoru s třepáním, při teplotě 28 °C, 160–200 RPM v tekutém LB médiu s příslušnými antibiotiky.

3.2.4.2 Agroinfiltrace

Narostlé bakteriální buňky inokulované v tekutém LB médiu byly odstředěny při 3700 g (Centrifuga Multifuge 3S-R, Heraeus, Německo) 10–15 minut při teplotě 22 °C. Supernatant byl slit a buněčný sediment byl resuspendován v infiltračním médiu (složení média popsáno v kapitole 3.1.4).

Následně byla změřena optická densita buněčné suspenze, která se pohybovala vždy v rozmezí OD = 0,5–1,2. Takto připravené bakteriální buňky byly inkubovány 2 hodiny při pokojové teplotě, uloženy ve stojánku na laboratorním stole. Následně byl, pomocí injekční stříkačky bez jehly infiltrován buněčný roztok do vnitřní části listů experimentálních rostlin. Injekční stříkačka byla vždy přitisknuta ze spodní (abaxiální) strany listu, mezi prstem a koncovou částí injekční stříkačky byl vytvořen mírný tlak a pomocí stlačení pístu byla pomalu vypuzena buněčná suspenze z injekční stříkačky do listu. Pro zachování čistoty práce bylo nutné mít na každý vzorek novou injekční stříkačku, případně byly častěji měněny laboratorní rukavice.

3.2.4.3 Mechanická inokulace

Experimentální rostliny *Nicotiana benthamiana* byly poprášeny tenkou vrstvou karborundového prášku tak, aby byly listy z vrchní strany lehce třpytivé s metalickým nádechem. Vytvořený rostlinný extrakt (postup popsán v kapitole 3.2.5.2) byl v malých kapičkách rozpipetován na jednotlivé listy (celkový objem 20 µl extraktu na 1 list, byl rozdělen do několika menších kapek pro lepší roztírání a vstřebávání listem). Kapky byly opatrně rozetřeny do plochy celého listu s vyvinutím drobného tlaku prstu proti listu. Aby bylo zabráněno kontaminaci při mechanické inokulaci, byl brán zvláště zřetel na střídání rukavic.

3.2.5 Sběr a zpracování rostlinného materiálu

3.2.5.1 Sběr materiálu

Rostlinný materiál byl sklizen ve formě malých listových disků (průměr disku asi 1 cm), které byly vyřezávány za pomoci korkovrtů – kovových trubiček o stejném průměru, umožňujících odběr rostlinného materiálu. Takto odebrané disky byly uchovávány pro další použití v mrazáku při -20 °C, nebo z nich byly ihned vytvořeny rostlinné extrakty.

3.2.5.2 Extrakce rostlinného materiálu

Odebrané listové disky byly po šesti umístěny do malých mikrozkušavek, opatřených šroubovacím víčkem, obsahujících spolu s listy ještě několik malých a jednu velkou mlecí kuličku pro lepší rozmělnění rostlinné tkáně. Zkušavky se vzorky byly zmrazeny v kapalném dusíku po dobu cca 5 minut a následně velmi rychle přemístěny do homogenizátoru (FastPrep®-24 *Classic* Instrument, MP Biomedicals, USA). Po první homogenizaci bylo ke každému vzorku přidáno 300 µl PBS a následně byla provedena ještě jedna homogenizace pomocí homogenizátoru. Takto připravené vzorky byly odstředěny v centrifuze po dobu 10 minut, 16000 g (Centrifuge Biofuge Pico, Heraeus, Německo) při pokojové teplotě. Po odstředění došlo k oddělení supernatantu od pevné fáze (rostlinného materiálu). Vzniklý supernatant byl opatrně odpipetován a přenesen do čisté mikrozkušavky. Vytvořený extrakt byl přímo využíván pro další molekulárně-biologické metody, nebo byl skladován při -20 °C.

3.2.6 Metody založené na práci s proteiny

3.2.6.1 SDS-PAGE

Metoda SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS) byla použita pro dělení proteinů, podle jejich velikosti, molekulární hmotnosti a pohyblivosti v polyakrylamidovém gelu. Vzniklý gel byl následně použit pro přenesení jednotlivých proteinových pásů na membránu a imunodetekci těchto proteinů pomocí protilátek při metodě Western blot.

Nejprve bylo nutné připravit separační a zaostřovací polyakrylamidové gely. Pro práci byl využit 15% separační gel a 5% zaostřovací gel. Rozpisy jednotlivých sloučenin a jejich navážky jsou uvedeny v Tabulkách 15 a 16.

Tabulka 15: Složení směsi pro přípravu 15% separačního polyakrylamidového gelu

Složka	jednotka	15% gel
ddH ₂ O	ml	1,25
40% acrylamide/bis	ml	2,51
Pufr 1	ml	1,25
10% ammonium persulfate	μl	50
TEMED	μl	5
Celkový objem	ml	5

Tabulka 16: Složení směsi pro přípravu 5% zaostřovacího polyakrylamidového gelu.

Složka	jednotka	5% zaostřovací gel
ddH ₂ O	ml	3,13
40% acrylamide/bis	ml	0,62
Pufr 2	ml	1,25
10% ammonium persulfate	μl	50
TEMED	μl	5
Celkový objem	ml	5

Aparatura pro nalévání gelů (BIO-RAD, USA) byla sestavena, mezi dvě sklíčka byl nalit 15% separační gel asi do výšky $\frac{3}{4}$ celého skla. Ještě tekutý roztok gelu byl převrstven vrstvou 70% etanolu, pro zabránění přístupu vzduchu a lepší polymerační schopnost. Po zatuhnutí byl tento gel přelit 5% zaostřovacím gelem až po okraj skla. Mezi dvě sklíčka byl opatrně vsunut hřeben pro tvorbu jamek. Po zatuhnutí celého gelu byl nejprve vyndán hřeben a poté byla skla i s gelem vložena do aparatury pro SDS-PAGE (BIO-RAD, USA).

Aparatura byla vyplněna elektroforetickým pufrem, který byl složen z:

- 80 ml 10x konc. SDS pufru
- 720 ml dH₂O

Pufr byl do aparatury doplněn až po rysku na elektroforetické vaně.

Vzorky byly připraveny následujícím způsobem:

- Rostlinný extrakt (popsáno v kapitole 3.2.5.2) byl smíchán se vzorkovým pufrem pro SDS-PAGE (složení pufru popsáno v kapitole 3.1.6) v poměru 1:1.
- Ke každému vzorku bylo nutné přidat 2-mercaptoethanol (k 1ml SDS-PAGE vzorkového pufru bylo přidáno 50μl 2-mercaptoethanolu).
- Připravený mix byl inkubován v termobloku, vyhřátém na 65 °C po dobu 3–5 minut.
- Vzorky byly odstředěny v centrifuze při 16000 g (Centrifuge Biofuge Pico, Heraeus, Německo) po dobu 5 minut.
- Do jamek gelu byly napipetovány připravené vzorky po 10 μl na jednu jamku.
- Jako marker byl použit Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, USA) v objemu 10 μl na jednu jamku.
- Elektroforetická migrace probíhala při napětí 50V po dobu 30 minut a poté byla hodnota napětí zvýšena na 120V.
- Elektroforéza probíhala až do doby, dokud čelo vzorků nebylo v dostatečné vzdálenosti ve spodní části gelu.

Po proběhnutí elektroforetického dělení proteinů byla sklíčka vyjmuta z aparatury, opatrně odklopena a gel byl přemístěn do aparatury pro přenos proteinů na membránu, nebo obarven pomocí CBB roztoku.

3.2.6.2 Barvení pomocí CBB (Coomassie Brilliant Blue)

Gel z SDS-PAGE byl pro obarvení jednotlivých proužků vložen do barvicího roztoku CBB (složení roztoku uvedeno v kapitole 3.1.7), který byl umístěn na orbitální třepačce. Po inkubaci byl roztok CBB slit a ve vaničce vyměněn za dH₂O. Vanička s gelem byla umístěna do mikrovlnné trouby a zahřána až do bodu varu. Poté byla H₂O slita a celý promývací proces byl ještě jednou zopakován. Pro lepší vychytávání zbylého barviva byla do misky přidána buničina. Odbarvený gel byl vyfotografován pomocí fotoaparátu (Olympus E-510, objektiv Zeiss 35 / 2.4).

3.2.6.3 Westernblot

Nejdříve bylo připraveno 6 kusů filtračního papíru (Munktell, Bio-Sciences AB, Švédsko) a 1 kus nitrocelulosevé membrány (Whatman, Protran, Německo) o velikosti gelu. Filtrační papíry a aparatura pro přenos proteinů na membránu (Omni-Bio, Brno, Česká republika) byly důkladně navlhčeny v transferovém pufru pro elektroforézu. Na důkladně navlhčenou aparaturu byly skládány nejprve 3 filtrační papíry těsně nasedající na sebe, poté polyakrylamidový gel, nitrocelulosevá membrána a další tři navlhčené filtrační papíry. Celá aparatura byla přiklopena anodou a dobře zatížena (ve spodní části katoda, na vrcholu anoda). Přenos probíhal při hodnotě proudu $0,8 \text{ mA/cm}^2$ (šířka x délka membrány x 0,8) po dobu 1,5 hodiny.

- Imunochemická detekce proteinů na membráně

Membrána, na kterou byl přenesen obsah gelu, byla ponořena do 5% roztoku mléka v PBS a inkubována přes noc na orbitální třepačce. Následně byla membrána vložena do větší uzavíratelné zkumavky s anti-TMV primární polyklonální králičí protilátkou (protilátka zředěna v PBS pufru v poměru 1:1000) vždy stranou membrány s přenesenými proteiny do roztoku protilátky. Celá zkumavka byla vložena do rotačního inkubátoru (Hybridiser HB-1D Incubator, Heraeus, Německo) na 1 hodinu při teplotě 24°C . Po uplynutí inkubační doby byla membrána 3x promyta v PBS, vždy po dobu 5 minut na orbitální třepačce. Po promytí byla přemístěna do velké zkumavky obsahující anti-králičí sekundární kozí protilátku s alkalickou fosfatázou. Inkubace probíhala 1,5 hodiny a následně byla membrána znovu 3x promyta, po dobu 5 minut v PBS na orbitální třepačce. Poté byla membrána obarvena pomocí **SIGMAFAST™ BCIP®/NBT** (Sigma-Aldrich, USA) komerčních tablet dle návodu výrobce.

3.2.6.4 Imunodetekční strip

Pro detekci kapsidového proteinu TMV, exprimovaného v experimentálních rostlinách byla použita ImmunoStrip® (Agdia, USA) komerční sada. Pro detekci viru byl třeba vzorek infiltrovaného listu o velikosti cca 2 cm^2 . Při použití imunodetekčních stripů bylo postupováno dle návodu výrobce.

3.2.6.5 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

K pozorování vzorků byl použit transmisní elektronový mikroskop (FEI Morgagni 268 D, FEI Company, USA), dále v textu pouze elektronový mikroskop. K pořízení a zpracování obrázku byl použit software pro analýzu iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions, Německo).

Pro přípravu vzorků TEM byly použity rostlinné extrakty (viz. kapitola 3.2.5.2). Tyto extrakty byly před použitím důkladně odstředěny při 14 000 g, po dobu 10 minut. Na membránu, vytvořenou z parafilmu těsně před přípravou vzorků, byla nanесena vždy jedna kapka vzorku (rostlinného extraktu) o objemu 15 μ l, 3 kapky redestilované H₂O z důvodů vypláchnutí přebytkého extraktu a iontů z povrchu mikroskopické síťky a 1 kapka uranyl acetátu (kapka o objemu 15 μ l). Jako poslední byly nanесeny další 2 kapky redestilované H₂O. Měděná síťka, potažená uhlíkovou membránou, byla nejprve inkubována na kapce rostlinného extraktu po dobu 20–30 minut, následně byla přemístěna na kapku vody (5 minut), velmi opatrně osušena dotykem hrany síťky o filtrační papír a přenesena na další kapku vody (5 minut). Poté byla mikroskopická síťka přenesena na roztok uranyl acetátu a barvena po dobu 5 minut. Krok promývání síťky byl po obarvení znovu zopakován. Síťka byla umístěna do držáku, nechána oschnout při pokojové teplotě (cca 45–60 minut) a přenesena k mikroskopu. Pomocí uranyl acetátu bylo vytvořeno negativní barvení vzorků. Vzorky na síťkách byly pozorovány pod elektronovým mikroskopem a obrázky byly vytvořeny za významné pomoci Mgr. Tomáše Moravce, PhD.

3.2.6.6 Imunoelektronová mikroskopie

Pro zvýšení množství částic na mikroskopické síťce byla v práci použita metoda založená na imunologickém, specifickém vychytávání částic pomocí protilátky. Pro specifické vychytávání částic byla použita anti-TMV primární polyklonální králičí protilátka (zředěná v PBS v poměru 1:30). Na membránu, vytvořenou z parafilmu, těsně před přípravou vzorků, byla nanесena jedna kapka protilátky o objemu 15 μ l. Síťka byla inkubována položená na kapce protilátky po dobu 30 min. Poté byla přemístěna do kapky vody na 5 minut, následně opatrně osušena dotykem hrany o filtrační papír a přemístěna na rostlinný extrakt. Od tohoto bodu byl postup přípravy vzorku pro elektronovou mikroskopii stejný jako v kapitole 3.2.6.5.

3.2.6.7 Detekce fluorescenčních markerů pomocí fluorescenčních filtrů a lamp

U infiltrovaných rostlin byla ověřována exprese vybraných genů pomocí detekce s nimi spřažených fluorescenčních markerů. Konstrukty vytvořené systémem GoldenBraid v kazetách obsahovaly geny pro GFP, YFP a dsRED. Infiltrované rostliny *Nicotiana benthamiana* byly po určité době (v závislosti na typu experimentu) ozářeny zdrojem světla o určité vlnové délce, specifické pro každý fluorescenční marker. Pro správnou detekci fluorescence bylo třeba se na ozářené rostliny dívat speciálním fluorescenčním filtrem (v práci používány filtry Roscolux, USA). V Tabulce 17 jsou přehledně zpracovány jednotlivé používané detekční markery

a všechny komponenty nutné pro jejich správnou detekci. Stejné filtry byly použity i pro pořízení obrazové dokumentace spolu se stativem, digitálním fotoaparátem Olympus E-520 nebo OM-D 5 a objektivem Zeiss Flektogon 35/ 2.4.

Tabulka 17: Používané detekční markery a komponenty nutné pro jejich detekci v rostlinách.

Protein	wtGFP	YFP	dsRED
Zdroj světelného záření	ruční nebo pevná UV lampa, 390–405 nm	modrá LED lampa, 480 nm	zelená LED lampa, 530 nm
Filtr	Žlutý Roscolux #12, StrawRoscolux #2003: Storaro Yellow	Žlutý Roscolux	Gypsy Red Roscolux 324

3.2.6.8 Světelná fluorescenční mikroskopie

Pro vizualizaci probíhající infekce byla použita fluorescenční mikroskopie. Z experimentálních rostlin byla odebrána část listu o velikosti přibližně 5x5 mm, která byla umístěna do kapky vody a přiklopena krycím sklíčkem. Pro pozorování vzorku byl použit fluorescenční mikroskop (Leica DM 5000 B), dále v textu pouze fluorescenční mikroskop, s vybraným fluorescenčním filtrem pro daný fluorescenční marker. Fotografie byly pořizovány pomocí zabudovaného digitálního fotoaparátu (Leica DFC490).

4 Výsledky

4.1 Tvorba genových konstruktů

Prvním krokem experimentální práce byla tvorba příslušných genových konstruktů. Při jejich klonování bylo často využito regulačních sekvencí silného konstitutivního 35S promotoru a Nos terminátoru. Sekvence 35S promotoru je odvozena od viru mozaiky kvěťáku (*CaMV*) a pro iniciaci transkripce a následnou expresi proteinů v rostlinách je hojně využívána (Odell *et al.*, 1985; Fang *et al.*, 1989). Nos terminátor, pocházející z genu pro nopalín syntázu, obsaženého v Ti plazmidu nopalínového typu *Agrobacterium tumefaciens* (Dymock *et al.*, 1991), je často využívaným terminátorem transkripce v rostlinných systémech. Pro zvýšení exprese transgenů byla do konstruktů klonována také matrix attachment sekvence RB7-MAR (Halweg *et al.*, 2005) z tabáku a gen pro protein p19 z tombusviru, potlačující umlčování genové exprese (suppressor of silencing) (Lakatos *et al.*, 2004). Podle klonovací metody, která byla využita pro tvorbu, mohou být konstrukty rozděleny do dvou skupin.

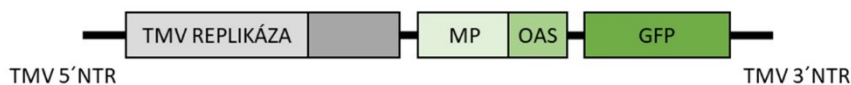
Skupina konstruktů č. 1: virové replikující se konstrukty, vytvořené klasickým klonováním

První skupina, virové replikující se konstrukty, byla klonována do binárních vektorů *pGR* a *pGR2i* (*i=intron*), odvozených od binárního plazmidu *pGreen*. K vložení vybraných genů do plazmidů bylo využito klasického klonování přes restriční místa, přirozeně se vyskytující ve virovém genomu. Konstrukty vzniklé touto cestou byly vytvořeny Mgr. Tomášem Moravcem, PhD. a Mgr. Lucií Kešnerovou v Laboratoři virologie, ÚEB AVČR. Jsou v laboratoři dlouhodobě používány a ověřeny, proto nebylo nutné konstrukty klonovat znovu jinou metodou (např. GoldenBraid). Z důvodů úspory času byly pro experimentální práci použity v existující podobě.

Virové replikující se konstrukty

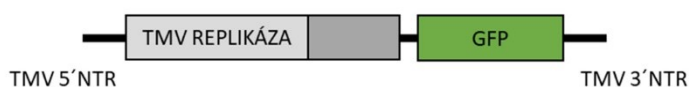
Virový replikující se konstrukt nesl vždy informaci pro virovou replikázu (RNA dependentní RNA polymerázu), která umožňovala replikaci virové RNA v cytoplasmě v tzv. cytoplasmatických replikačních továrnách. Pro experiment byly využity virové vektory, založené na viru mozaiky tabáku a X viru bramboru.

pGR2i: ΔCP-GFP



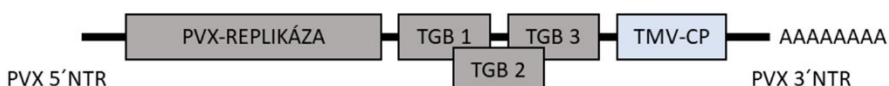
Konstrukt obsahující *CaMV* 35S promotor, 5'NTR oblast viru tabákové mozaiky a virovou replikázu (RNA dependentní RNA polymerázu) viru tabákové mozaiky. Konstrukt dále obsahoval pohybový protein (MP), v jehož sekvenci je obsažena informace pro počátek sbalování (OAS) a 3'NTR oblast viru tabákové mozaiky. RNA viru TMV nemá polyA konec, autentický konec byl zajištěn pomocí hammerhead ribozymu, za kterým následoval Nos terminátor. Pro snadnou detekci byl na místo kapsidového proteinu vložen gen pro fluorescenční marker GFP (Green fluorescent protein). Tento konstrukt (pGR2i: ΔCP-GFP) byl navržen pro produkci virové RNA v tzv. replikačních továrnách, za nepřítomnosti sekvence pro kapsidový protein (CP) na RNA viru.

pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP



Konstrukt obsahující *CaMV* 35S promotor, 5'NTR oblast TMV, zachovanou funkci virové RNA dependentní RNA polymerázy, detekční fluorescenční marker GFP, 3'NTR oblast TMV, ribozym a Nos terminátor pro ukončení transkripce. Konstrukt se vyznačoval absencí pohybového proteinu (MP) se sekvencí OAS a delecí genu pro CP protein. V provedených experimentech byla tímto konstruktem tvořena modifikovaná virová RNA, nesoucí pouze funkční gen pro virovou replikázu. Pro šíření konstruktů mezi buňkami bylo nutné používat transgenní 3H rostliny, exprimující MP protein.

pGR: PVX-U1-ΔCP



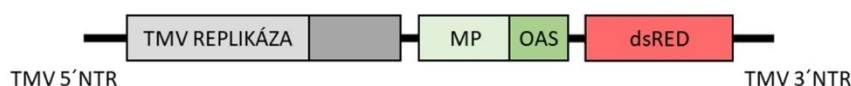
Poslední z virových vektorů (konstruktů), pGR: PVX-U1-ΔCP byl odvozen z X viru bramboru. Genomová informace viru obsahovala delecí celého kapsidového proteinu (PVX – CP) a na jeho místo byl zaklonován kapsidový protein viru tabákové mozaiky (TMV – CP). V konstruktu byly použity regulační oblasti *CaMV* 35S promotoru a Nos terminátoru. V navržených experimentech byla hlavní funkcí tohoto konstruktu exprese TMV – CP proteinu ve virových replikačních továrnách.

Skupina č. 2: konstrukty vytvořené pomocí klonovací metody GoldenBraid

Druhá skupina konstruktů byla vytvořena pomocí klonovací metody GoldenBraid (detailněji popsán v kapitole 2.7.). Pro klonování základních GB částí bylo využito pUPD a pUPD2 univerzálních domestikačních plazmidů, které obsahovaly *LacZ* gen pro β-galaktosidázu, umožňující modrobílou selekci správně zaklonovaných konstruktů v plazmidu. Dále také gen pro selekční marker (resistence k *ampicillinu* nebo *chloramphenicolu*) a počátek replikace pro *Escherichia coli* MB1. Pro následné skládání do vícekomponentových konstruktů byly použity dva typy pDGB vektorů. pDGB1α je založen na kostře plazmidu pGreen II (Hellens *et al.*, 2000) a obsahuje gen resistance pro *kanamycin*, gen pro β-galaktosidázu a počátky replikace SA a pUC. Jde o velmi malé vektory, samotná kostra má délku přibližně 2600 bp, pro infiltraci bylo nutné použití *Agrobacterium tumefaciens*, obsahujícího helper plazmid, například *GV 3103*. Vektor pDGB3Ω je založen na kostře plazmidu pCambia a obsahuje gen resistance ke *spectinomycinu* a gen pro β-galaktosidázu.

1) Virový replikující se konstrukt vytvořený klonovací metodou GoldenBraid

pDB1α2: 35S-TMV-ΔCP-dsRED

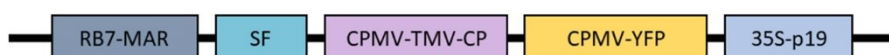


Konstrukt kódující v sekvenci RNA všechny důležité geny viru tabákové mozaiky s delecí kapsidového proteinu CP. Místo něho byl do konstruktu zaklonován fluorescenční marker pro dsRED. Jako regulační sekvence byly použity *CaMV* 35S promotor a Nos terminátor. Sekvence je velmi podobná konstruktu pGR2i: ΔCP-GFP, pouze v sekvenci Rep a MP bylo provedeno celkem pět synonymních mutací, které sloužily k odstranění interních míst BsaI a BsmBI.

2) pEAQ konstrukty

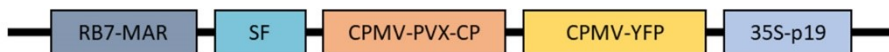
Originální konstrukty řady pEAQ jsou založeny na použití 5'NTR a 3'NTR sekvence RNA-2 viru mozaiky vigny (CPMV). Tyto NTR oblasti zajišťují nadprůměrnou expresi požadovaných genů v cytoplasmě rostlinné buňky (Sainsbury *et al.*, 2009; Peyret & Lomonossoff, 2013). pEAQ konstrukty se díky absenci virové replikázy dále nemnoží, ale jejich transkripcí se vytváří mRNA, která je velmi stabilní, silně váže ribozómy a v cytoplasmě přetrvává dlouhou dobu. V naší práci jsme nejprve domestikovali potřebné části dle GoldenBraid konvence-35S promotor spolu s 5'NTR viru CPMV jako jednu část a 3'NTR spolu s Nos terminátorem jako druhou část. Mezi tyto části lze pak restrikčně-ligační reakcí vložit libovolný ORF odpovídající GB konvenci. Pro odlišení od jiných typů vektorů bylo v názvosloví nových vektorů ponecháno označení pEAQ.

pDB3Ω2: pEAQ TMV-CP-YFP



pEAQ vektor nesoucí 5'NTR a 3'NTR RNA-2 viru mozaiky vigny (CPMV), gen pro kapsidový protein viru tabákové mozaiky a gen pro protein p19, potlačující umlčování genové exprese. Jako fluorescenční marker byl pro snazší detekci použit gen pro YFP (Yellow fluorescent protein). Pro zvýšení exprese transgenu byla do konstruktů klonována sekvence RB7-MAR. Hlavní funkcí konstruktů byla produkce kapsidového proteinu viru tabákové mozaiky (TMV – CP) volně v cytoplasmě.

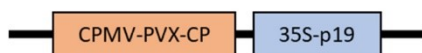
pDB3Ω2: pEAQ PVX-CP-YFP



pEAQ vektor nesoucí 5'NTR a 3'NTR RNA-2 viru mozaiky vigny (CPMV), gen pro kapsidový protein X viru bramboru a gen pro protein p19. Dále také gen pro fluorescenční marker YFP (Yellow fluorescent protein) a sekvenci RB7-MAR. Sekvence SF je 35 bází dlouhý linker

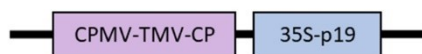
(stuffer fragment), jehož jedinou funkcí je doplnit počet skládaných kazet na pět, aby byla zachována konvence. Hlavní funkcí konstruktů byla produkce kapsidového proteinu X viru bramboru (PVX-CP) volně v cytoplasmě.

pDB3Ω1: pEAQ PVX-CP



Jednodušší verze pEAQ vektoru, mající pouze dvě zaklonované kazety a nesoucí 5'NTR a 3'NTR RNA-2 viru mozaiky vigny (CPMV). Kazety kódují geny pro PVX-CP a p19, potlačující umlčování genové exprese. Konstrukt v sobě nemá zaklonovaný žádný detekční fluorescenční marker, což ztěžuje jeho detekci v rostlinném materiálu. Hlavní funkcí byla tvorba kapsidového proteinu X viru bramboru volně v cytoplasmě. Exprese PVX sloužila jako kontrola specifity interakce kapsidového proteinu a RNA.

pDB3Ω1: EAQ TMV-CP



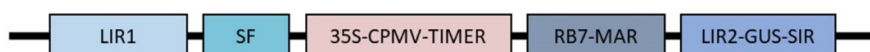
Jednodušší verze pEAQ vektoru, nesoucí 5'NTR a 3'NTR RNA-2 viru mozaiky vigny (CPMV) a dvě kazety, kódují geny pro TMV-CP a p19. V konstruktě není zaklonován žádný gen pro fluorescenční marker. Hlavní funkcí tohoto konstruktů byla tvorba kapsidového proteinu TMV – CP volně v cytoplasmě.

3) pRIC konstrukty

Expresní konstrukty série pRIC byly odvozeny od viru žluté zakrslosti fazolu (BeYDV), patřícího do rodiny *Geminiviridae*. V původním provedení (Regnard *et al.*, 2010) jde o téměř úplnou kopii genomu BeYDV, ve které byly geny na virion sense rameni (movement protein akapsidový protein) nahrazeny kazetou s 35S promotorem, 5'NTR oblastí chalkon-syntázy z tabáku a Nos terminátorem. Celý konstrukt je ohraničen sekvencemi LIR, které vymezují tu část T-DNA, ze které vzniká cirkulární replikon. Výhodou tohoto systému je velké množství cirkulární DNA, které se vytvoří v jádře buňky a která následně slouží jako templát pro tvorbu

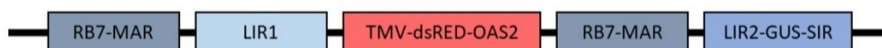
mRNA a poté i velkého množství kóženého proteinu (Chen *et al.*, 2011). V naší práci jsme nejprve z původního vektoru vytvořili 4 domestikované části – dvě verze sekvence LIR, sekvenci krátké intergenové repetice SIR a gen pro virový Rep/RepA protein. Z těchto dílů pak lze v rámci GB konvence sestavovat různé variace *geminivirových* replikonů obsahující až 3 samostatné kazety. Další výhodou je schopnost snadno vytvořit i vektory, ve kterých je gen pro Rep/RepA protein poskytnut *in trans*, protože jeho přítomnost přímo v replikonu často vede k předčasné smrti infikovaných buněk. Pro odlišení od jiných vektorů bylo v názvosloví BeYDV replikonů ponecháno označení pRIC.

pDB3Q1: RIC 100 TIMER



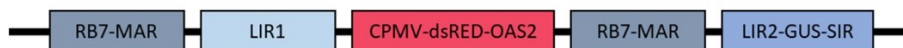
pRIC konstrukt nesoucí intergenní sekvence LIR1, LIR2 a expresní kazetu pro Timer (fluorescenční marker postupně měnící emisi ze zelené na červenou). V konstruktu byla také zaklonována RB7-MAR kazeta, zvyšující expresi transgenu. Hlavní funkcí tohoto konstruktu byla produkce RNA bez sekvence počátku sbalování TMV-OAS.

pDB3Q1: RIC 102



pRIC konstrukt nesoucí intergenní sekvence LIR1 a LIR2, dsRED (červěný fluorescenční marker) a počátek enkapsidace (OAS) pro virus tabákové mozaiky. V konstruktu byla také zaklonována RB7-MAR kazeta, zvyšující expresi transgenu. Hlavní funkcí tohoto konstruktu byla produkce RNA s počátkem sbalování TMV-OAS.

pDB3Q1: RIC 103



pRIC konstrukt nesoucí intergenní sekvence LIR1 a LIR2, dsRED (červěný fluorescenční marker), vložený mezi 5' a 3'NTR oblasti viru mozaiky vigny (CPMV). Dále byl do konstruktu zaklonován počátek enkapsidace (OAS) pro virus tabákové mozaiky a kazeta RB7-MAR, zvyšující expresi transgenu. Hlavní funkcí tohoto konstruktu byla produkce RNA s počátkem sbalování TMV-OAS.

pDB3Ω1: RIC 105



pRIC konstrukt nesoucí intergenční sekvence LIR1 a LIR2, SF (stuffer) fragment, TMV-CP kazetu vloženou mezi 5' a 3'NTR oblasti viru mozaiky vigny (CPMV). Dále byla do konstruktů zaklonována kazeta RB7-MAR, zvyšující expresi transgenu. Hlavní funkcí tohoto konstruktů byla produkce kapsidového proteinu TMV-CP.

pDB3Ω1: RIC 106



pRIC konstrukt nesoucí intergenční sekvence LIR1 a LIR2, SF (stuffer) fragment, PVX-CP kazetu, vloženou mezi 5' a 3'NTR oblasti viru mozaiky vigny (CPMV). Dále byla do konstruktů zaklonována kazeta RB7-MAR, zvyšující expresi transgenu. Hlavní funkcí konstruktů byla produkce kapsidového proteinu PVX-CP.

pDB3Ω2: Rep/RepA-p19



Konstrukt obsahující gen pro virový Rep/RepA protein (Replicase association protein) a p19, potlačující umlčování genové exprese. Tento konstrukt byl vždy přidáván k jednotlivým pRIC vzorkům *in trans*, aby mohlo docházet k jejich replikaci.

4.2 Provedené experimenty

4.2.1 Detekce virového kapsidového proteinu (CP)

Pro detekci kapsidového proteinu (CP) byly použity metody, založené na imunologickém stanovení a reverzní transkripci s následnou PCR. Nejprve byla provedena optimalizace metody SDS-PAGE a Western blot. Bohužel se nepodařilo optimalizovat metodu pro spolehlivou a citlivou detekci kapsidového proteinu v rostlinných pletivech. Problém pravděpodobně vznikl z důvodů malého množství produkovaného kapsidového proteinu, oproti přirozené virové infekci. U metody reverzní transkripce a následné PCR se nepodařilo optimalizovat metodu a spolehlivě detekovat virovou mRNA, tyto problémy jsou zapříčiněny pravděpodobně podobnými důvody. Pro detekci kapsidového proteinu byla následně využita imunochemická metoda Imunostripů (Agdia, USA), kterou byla velmi citlivě a rychle detekována přítomnost virového kapsidového proteinu ve vzorku experimentálního rostlinného materiálu. Metoda Imunostripů byla využita hlavně z důvodů časové úspory a ceny, v porovnání s výše zmíněnými metodami (SDS-PAGE, Western blot) byla plně srovnatelnou metodou detekce.

4.2.2 Studium významu buněčné kompartmentace při vzniku virových částic

4.2.2.1 Koinfiltrace rostlin dvěma různými konstrukty

Pro koinfiltraci rostlin za účelem pozorování významu buněčného kompartmentu při vzniku částic byl využit systém dvou konstruktů. pEAQ bez zaklonovaného fluorescenčního vizuálního markeru v RNA a pGR virového konstruktů se zaklonovaným GFP vizuálním markerem.

Divoký kmen (wt) viru tabákové mozaiky v přirozených podmínkách vytváří infekční částice, schopné přenosu mezi buňkami a systémového šíření. Replikace wt viru TMV probíhá v tzv. replikačních továrnách (strukturách odvozených od endoplasmatického retikula), které zajišťují přítomnost virové RNA i kapsidového proteinu (CP) v jednom uzavřeném prostoru. Pro sledování důležitosti kompartmentace v procesu sbalování částice byl navržen systém virových konstruktů na základě několika virových systémů. V buněčných replikačních továrnách se replikuje RNA viru TMV, nesená virovým konstruktem pGR. V některých experimentálních kombinacích je poskytnut příslušný kapsidový protein prostřednictvím dalšího RNA viru PVX, který se rovněž replikuje v replikačních továrnách nebo prostřednictvím pEAQ vektoru, který replikační továrny nevytváří. Silná vazba na ribozomy zprostředkuje dostatečnou expresi proteinu našeho zájmu v cytoplasmě buňky.

Cíle experimentu

- Sledovat význam a důležitost tzv. replikačních továren pro vznik virových částic.
- Potvrdit vznik částic na základě pozorované systémové infekce.
- Detekovat vzniklé virové částice pomocí imunochemických metod.

Provedení experimentu

Použité konstrukty

- 1) pDB3Ω1: EAQ PVX-CP (bez fluorescenčního markeru)
- 2) pDB3Ω1: EAQ TMV-CP (bez fluorescenčního markeru)
- 3) pGR2i: ΔCP-GFP
- 4) pGR: PVX-U1-ΔCP

Kombinace vzorků, koinfiltrovaných do experimentálních rostlin *Nicotiana benthamiana* jsou uvedeny v Tabulce 18.

Tabulka 18: Kombinace konstruktů 1) pGR2i: ΔCP-GFP + pGR: PVX-U1-ΔCP (pozitivní kontrola vzniku infekčních částic), 2) pGR2i: ΔCP-GFP + pDB3Ω1: EAQ TMV-CP a 3) pGR2i: ΔCP-GFP + pDB3Ω1: EAQ PVX-CP kombinace konstruktů, sloužící pro studium významu buněčn

Číslo vzorku	kombinace infiltrovaných vzorků	počet infiltrovaných listů	typ rostliny
1	pGR2i: ΔCP-GFP + pGR: PVX-U1-ΔCP	2 rostliny, vždy 3 spodní listy, pozitivní kontrola	<i>Nicotiana b.-wt</i>
2	pGR2i: ΔCP-GFP + pDB3Ω1: EAQ TMV-CP	2 rostliny, vždy 3 spodní listy, experimentální rostlina	<i>Nicotiana b.-wt</i>
3	pGR2i: ΔCP-GFP + pDB3Ω1: EAQ PVX-CP	2 rostliny, vždy 3 spodní listy, negativní kontrola	<i>Nicotiana b.-wt</i>

4.2.2.2 Výsledky experimentu

Z dosud popsaného mechanismu sbalování virové částice TMV bylo předpokládáno, že pro tvorbu infekčních částic je důležitá koinfiltrace konstruktů zajišťujících produkci TMV – CP a RNA viru tabákové mozaiky v jedné buňce v prostoru ohraničeném membránou

(replikačních továrnách). Pokud by částice vznikaly, jejich přítomnost by se měla projevit schopností viru šířit se rostlinným systémem do nejmladších, vrcholových listů a schopností mechanického přenosu na jinou rostlinu. Tuto hypotézu jsme se snažili vyvrátit použitím konstruktů, které měly zajistit existenci TMV – CP a RNA v jedné buňce, primárně ne v prostoru replikačních továren současně. Virový konstrukt pGR2i: ΔCP-GFP měl zajistit expresi virové RNA s delecí kapsidového proteinu TMV-CP v cytoplasmatických replikačních továrnách. Druhý konstrukt pDB3Ω1: EAQ TMV-CP měl naopak zajistit expresi kapsidového proteinu volně v cytoplasmě (viz kapitola 1.1). Jako pozitivní kontrola byla zvolena kombinace dvou virových konstruktů, pGR2i: ΔCP-GFP + pGR: PVX-U1-ΔCP, z nichž každý měl za úkol tvořit jednu složku nutnou pro sbalení částice (RNA, TMV-CP). Expresy genů těchto konstruktů by podle předpokladů měla probíhat současně v replikačních továrnách. Jako negativní kontrola byla zvolena kombinace konstruktů pGR2i: ΔCP-GFP + pDB3Ω1: EAQ PVX-CP. Bylo předpokládáno, že interakce RNA viru tabákové mozaiky s CP je specifická a na RNA se váže specificky pouze vlastní kapsidový protein, nikoli kapsidové proteiny jiných virových druhů. Proto byl jako negativní kontrola použit konstrukt exprimující kapsidový protein viru PVX.

Experiment ukázal, že virové částice vznikaly jak v rostlině obsahující kontrolní kombinaci vzorků pGR2i: ΔCP-GFP + pGR: PVX-U1-ΔCP, tak i v rostlinách obsahujících experimentální kombinaci vzorků pGR2i: ΔCP-GFP + pDB3Ω1: EAQ TMV-CP. Systémové šíření konstruktů bylo zaznamenáno na základě fluorescenčního markeru GFP (Green fluorescent protein) zaklonovaného v jednom z konstruktů. Fluorescenční marker byl pozorován za pomoci osvětlení UV LED diodami a barevného filtru (Roscolux, USA). Po 14–20 dnech bylo detekováno systémové šíření u vzorku č. 1 (2 ze 2 rostlin) a u vzorku č.2 (1 ze 2 rostlin). U vzorku č. 3 (negativní kontroly) nebylo detekováno žádné systémové šíření, což odpovídá předpokladu, že ke vzniku infekčních částic dojde pouze díky specifické interakci virové RNA s odpovídajícím kapsidovým proteinem. Vznik částic byl potvrzen i mechanickým přenosem na další rostliny. Závěrem tohoto experimentu je, že ke vzniku infekčních částic dochází i v případě, že je kapsidový protein exprimován volně v cytoplasmě mimo virové replikační továrny.

Použité verze konstruktů pEAQ, navržené pro expresi CP obsahovaly genové kazety pouze pro kapsidový protein a supresor silencingu P19. Vzhledem k tomu, že úroveň exprese po infiltraci se mezi několika provedenými pokusy velmi lišila a v některých případech se stalo, že *Agrobacterium tumefaciens* s konstruktem pro kapsidový protein selhalo, v reakci na tutu

skutečnost byl vytvořen nový konstrukt, který kromě kapsidového proteinu produkoval rovněž vizuální marker YFP.

4.2.3 Koinfiltrace rostlin konstrukty se zaklonovaným vizuálním markerem

Experiment byl navržen podobně jako předchozí experiment (kapitola 4.2.2.) s tím, že byly použity vylepšené pEAQ konstrukty. Nové verze pEAQ exprimují kromě kazety s kapsidovým proteinem (TMV nebo PVX-CP) ještě kazetu pro expresi fluorescenčního detekčního markeru YFP. Lze tak snadněji určit oblast, ve které v infiltrovaných listech dochází k expresi a akumulaci kapsidového proteinu.

Cíle experimentu

- Sledovat význam a důležitost tzv. replikačních továren pro vznik virových částic.
- Potvrdit vznik částic na základě pozorované systémové infekce.
- Sledovat průběh šíření infekce v obou typech rostlin *Nicotiana benthamiana* (wt, 3H) současně.
- Detekovat vzniklé virové částice pomocí imunochemických metod.

Provedení experimentu

Použité konstrukty

- 1) pGR2i: ΔCP-GFP
- 2) pDB3Ω2: EAQ PVX-CP-YFP
- 3) pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP

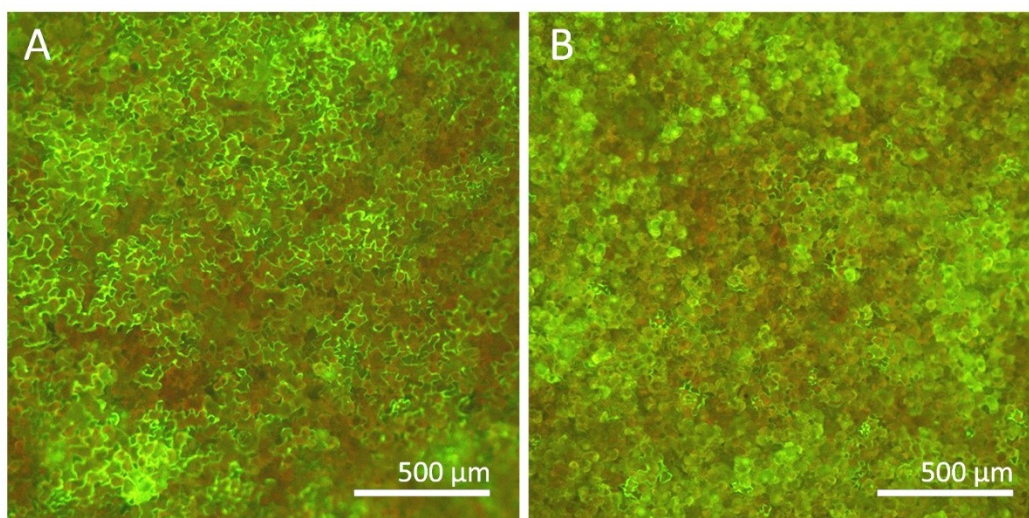
Kombinace vzorků, koinfiltrovaných do experimentálních rostlin *Nicotiana benthamiana* jsou uvedeny v Tabulce 19.

Tabulka 19: Kombinace konstruktů 1) pGR2i: ΔCP-GFP + pDB3Ω1: EAQ TMV-CP-YFP, infiltrovány rostliny *Nicotiana benthamiana* wt; 2) pGR2i: ΔCP-GFP + pDB3Ω1: EAQ TMV-CP-YFP, infiltrovány rostliny *Nicotiana benthamiana* 3H; 3) pGR2i: ΔCP-GFP, negativní kontrola

Číslo vzorku	vzorek infiltrovaný v den 0	konstrukt přidáný v den 3 od infiltrace	typ rostliny	typ vzorku
1	pGR2i: ΔCP-GFP	pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-wt</i>	experimentální
2	pGR2i: ΔCP-GFP	pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-3H</i>	experimentální
3	pGR2i: ΔCP-GFP	-	<i>Nicotiana b.-wt</i>	kontrolní
4	pDB3Ω1: EAQ PVX-CP-YFP	-	<i>Nicotiana b.-wt</i>	kontrolní

Výsledek experimentu

Experimentem bylo detekováno systémové šíření kombinací experimentálních konstruktů pGR2i: ΔCP-GFP + pDB3Ω2:EAQ TMV-CP-YFP (vzorky č. 1–4, tabulka 19). Toto zjištění koresponduje s výsledkem prvního pokusu (viz. 4.2.2) a ukazuje, že infekční virové částice vznikají i bez nutnosti existence RNA a CP v uzavřeném prostoru kompartmentu. Součástí experimentu bylo zároveň sledování průběhu virové infekce ve dvou různých typech experimentální rostliny *Nicotiana benthamiana* (wt, 3H) a ověření funkčnosti konstruktů s vizuálním markerem YFP. Experimentem bylo ověřeno, že šíření konstruktů z buňky do buňky a systémový přenos u 3H i WT rostlin *Nicotiana benthamiana* probíhá téměř se stejnou intenzitou. Z pozorování rostlin v experimentu se zdálo, že pro šíření infekce v případě těchto konstruktů není s výhodou 3H rostlina obsahující transgenní MP. Jednotlivé konstrukty, tvořící RNA a CP byly do buňky infiltrovány v různém časovém intervalu (viz tabulka 19). Tato časová prodleva hrála v experimentu překvapivě velký význam. Zdálo se, že se zvýšila pravděpodobnost vzniku částic a na základě toho docházelo k silnějšímu a rychlejšímu nástupu systémové infekce. Čas nutný pro rozvoj infekce a následné započetí systémového šíření se o poznání snížil. Pozorování prvních náznaků systémové infekce se oproti pokusu bez časové prodlevy snížil zhruba o 5 dní. Toto zjištění může být vysvětleno tak, že při současné koinfiltraci rostliny oběma konstrukty dochází k rychlejší a masivnější tvorbě kapsidového proteinu pomocí pEAQ konstruktů a následnému možnému vzniku resistance některých rostlin, což by vysvětlovalo pomalejší průběh celého systémového šíření a v některých případech jeho nedostatečnou a složitou detekci v prvním experimentu (viz výsledky 4.2.2). Systémové šíření konstruktů bylo zaznamenáno pomocí fluorescenčního markeru GFP (Green fluorescent protein), který byl sledován pod fluorescenčními filtry (Roscolux, USA) za pomoci osvětlení UV LED diodami. Po cca 10 dnech od první infiltrace bylo detekováno systémové šíření u rostlin. Určení listů s vysokou expresí kapsidového proteinu bylo díky přítomnosti fluorescenčního markeru YFP možné provést pozorováním listů za pomoci fluorescenčního mikroskopu (Leica DM 5000 B). Výsledky mikroskopování jsou ilustrovány na Obrázku 15.



Obrázek 15: Detekce exprese kapsidového proteinu v rostlinách pomocí pEAQ konstruktů obsahujících zároveň YFP fluorescenční marker. A) vzorek listu s infiltrovaným konstruktem pDB3Q2: EAQ TMV-CP-YFP (žluté zbarvení dobře detekovatelné), B) vzorek listu s infiltrovaným konstruktem pDB3Q2: EAQ PVX-CP-YFP (žluté zbarvení dobře detekovatelné). Vzorky listů byly pozorovány pomocí světelného fluorescenčního mikroskopu (Leica DM 5000 B) s vybraným fluorescenčním filtrem pro daný fluorescenční marker. Fotografie byly pořizovány pomocí zabudovaného digitálního fotoaparátu (Leica DFC490).

Pro potvrzení přítomnosti kapsidového proteinu TMV-CP ve vzorcích byl použit detekční Imunostrip (Agdia, USA), kterým se podařilo citlivě a rychle detekovat přítomnost virového kapsidového proteinu ve vzorku experimentálního rostlinného materiálu. Díky současnému průběhu těchto dvou detekčních testů můžeme potvrdit, že žlutě fluoreskující sektory, pozorované pod fluorescenčním mikroskopem opravdu obsahují kapsidový protein. Zelené a žluté zbarvení detekčních fluorescenčních markerů (GFP, YFP) bylo pod fluorescenčním mikroskopem bezpečně rozpoznatelné.

4.2.4 Studium významu sekvence OAS při vzniku virových částic

4.2.4.1 Koinfiltrace rostlin virovými konstrukty s a bez obsahu sekvence OAS v RNA konstruktu

Z experimentů popsaných v *in vitro* podmínkách bylo zjištěno, že sekvence počátku sbalování (OAS) hraje při iniciaci enkapsidace RNA klíčovou roli. Tento experiment byl proveden s cílem studovat důležitost této sekvence při tvorbě virové částice. V experimentu jsme použili TMV vektory lišící se přítomností nebo absencí OAS sekvence a barvou fluorescenčního markeru. K nim byl přidán nereplikující se konstrukt pro tvorbu TMV-CP. Po době nutné pro vytvoření částic byl z listů připraven extrakt a ten mechanicky přenesen na další rostliny. Porovnáním počtu červených a zelených infekčních ohnisek byla odhadnuta účinnost tvorby částic a význam přítomnosti OAS sekvence.

Cíle experimentu

- Sledovat nutnost sekvence OAS pro vznik virových částic.
- Potvrdit vznik částic na základě pozorované systémové infekce.
- Detekovat vzniklé virové částice pomocí imunochemických metod.
- Detekovat vzniklé částice pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Provedení experimentu

Použité konstrukty:

- 1) pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP
- 2) pGR2i: ΔCP-GFP
- 3) pDB1α2: 35S-TMV-ΔCP-dsRED
- 4) pDB3Ω2: EAQ PVX-CP-YFP
- 5) pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP

Kombinace vzorků, koinfiltrovaných do experimentálních rostlin *Nicotiana benthamiana* jsou uvedeny v Tabulce 20.

Tabulka 20: Kombinace konstruktů 1) pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED + pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP 2) pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED + pDB3Ω2: EAQ PVX-CP-YFP; 3) pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED (kontrolní vzorek,

Číslo vzorku	vzorek infiltrovaný v den 0	konstrukt přidáný v den 5	typ rostliny	typ vzorku
1	pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED	pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-3H</i>	experimentální vzorek bez přítomnosti sekvence OAS v exprimované RNA, kombinace se specifickým CP (TMV-CP)
2	pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED	pDB3Ω2: EAQ PVX-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-3H</i>	negativní kontrola exprimující RNA bez přítomnosti OAS sekvence a obsahující CP jiného viru (nespecifický PVX-CP)
3	pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED	-	<i>Nicotiana b.-3H</i>	negativní kontrola bez přítomnosti CP
4	pGR2i: ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED	pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-3H</i>	experimentální vzorek s přítomností sekvence OAS v exprimované RNA, kombinace se specifickým CP (TMV-CP)
5	pGR2i: ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED	pDB3Ω2: EAQ PVX-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-3H</i>	negativní kontrola exprimující RNA s přítomností OAS sekvence a obsahující CP jiného viru (nespecifický PVX-CP)
6	pGR2i: ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED	-	<i>Nicotiana b.-3H</i>	negativní kontrola bez přítomnosti CP

Výsledky experimentu

U infiltrovaných rostlin nebyla pozorována systémová infekce, byl ale patrný rozdíl mezi expresí fluorescenčního markeru GFP v konstruktech pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP a pGR2i: ΔCP GFP. Expres konstruktu pGR2i: ΔCP-GFP se na základě pozorování zdála být silnější. Šíření ohnisek GFP bylo mnohem rychlejší a masivnější v kombinaci s přidáním pEAQ vektorem. Skutečnost, že nedošlo k systémovému rozšíření infekce, mohla být způsobena stářím rostlin. Infekčnost vzniklé virové RNA byla pozorována přenesením extraktu na zdravé rostliny (popsáno v kapitolách 4.2.4.2 a 4.2.4.3). Přítomnost podjednotek kapsidového proteinu TMV-CP byla ověřena detekčním Imunostripem (Agdia, USA) a přítomnost virových částic byla ověřena transmisní elektronovou mikroskopií. Tvorba částic a jejich infekčnost v rostlinném materiálu u konstruktů s kódující sekvencí OAS nebo její delecí byla ověřena mechanickým přenesením extraktů z infiltrovaných rostlin na rostliny zdravé (popis viz odstavce 4.2.4.2 a 4.2.4.3)

4.2.4.2 Ověření infekčnosti virových částic přenosem extraktů na zdravé rostliny

Pro ověření infekčnosti vzniklých částic a optimalizaci přenosové metody infiltrace pomocí karborundového prášku, byly přeneseny extrakty z rostlin infiltrovaných konstrukty v experimentu 4.2.4.1. Schéma přenosu rostlinných extraktů na experimentální rostliny je uvedeno v Tabulce 21.

Cíle experimentu.

- Potvrdit tvorbu částic ve vzorcích na základě pozorování infekčních okrsků pomocí detekčních fluorescenčních markerů.
- Detekovat vzniklé virové částice pomocí imunochemických metod.
- Detekovat vzniklé částice pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Provedení experimentu

Použité konstrukty:

- 1) pGR2i: ΔCP-GFP
- 2) pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP
- 3) pGR: PVX-U1-ΔCP

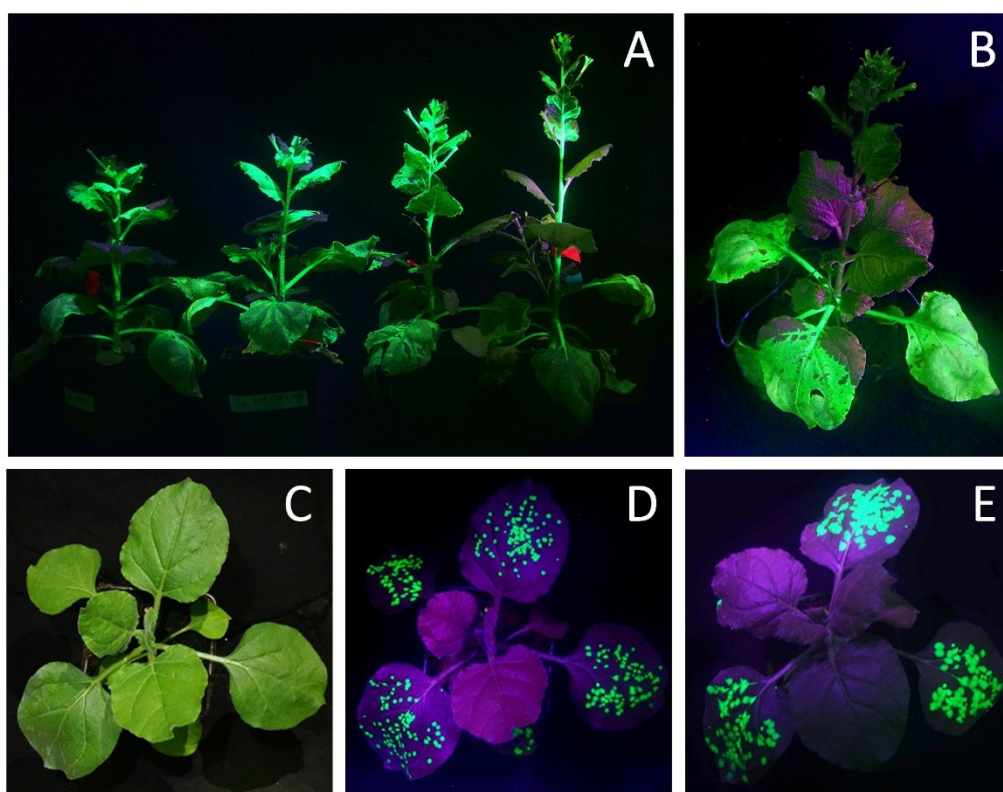
Tabulka 21: Přenášené rostlinné extrakty vytvořené z rostlin infiltrovaných v experimentu 4.2.4.1. Vzorek: 1) negativní kontrola; 2) pozitivní kontrola; 3) experimentální vzorek; 4) negativní kontrola, obsahuje extrakt z horního listu z rostlin u kterých

Číslo vzorku	přenášený vzorek	typ rostliny	typ vzorku
1	pGR2i: ΔCP-GFP	<i>Nicotiana b.-wt</i>	negativní kontrola bez CP
2	pGR: PVX-U1-ΔCP+ pGR2i: ΔCP-GFP	<i>Nicotiana b.-wt</i>	pozitivní kontrola
3	pGR2i: ΔCP-GFP + pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-wt</i>	experimentální vzorek
4	pGR: PVX-U1-ΔCP (syst. šíření) + pGR2i: ΔCP-GFP	<i>Nicotiana b.-wt</i>	negativní kontrola

Výsledky experimentu

Konstrukt pGR2i: ΔCP-GFP, díky kterému se v buňce tvořila pouze modifikovaná RNA viru tabákové mozaiky byl do buněk infiltrován samostatně. Kvůli nepřítomnosti kapsidového proteinu nemohly v buňce vznikat virové částice, proto byl tento konstrukt zvolen jako negativní kontrola. Extraktem z rostlin infiltrovaných tímto konstruktem by nemělo být možné

mechanicky infikovat další rostliny. Tento předpoklad byl experimentálně potvrzen. Stejně tak nebylo možné přenést infekci ani extraktem z horního, systémově infikovaného listu, který obsahoval pouze virovou RNA. Při koinfiltrace dvou konstruktů (pGR: PVXU1- Δ CP+ pGR2i: Δ CP-GFP) nebo (pDB3 Ω 2: EAQ TMV-CP-YFP+ pGR2i: Δ CP-GFP) docházelo jak k tvorbě virové RNA, tak i kapsidového proteinu, proto by v infiltrovaných rostlinných buňkách měly vznikat infekční virové částice. Tento předpoklad byl potvrzen detekcí infekčních ohnisek na sekundárních mechanicky inokulovaných listech. Infekčních ohnisek však bylo oproti předpokladu celkově poměrně málo, což bylo zřejmě ovlivněno stářím mechanicky inokulovaných rostlin. Pozorování systémového šíření z experimentu 4.2.4.1 a infekčních ložisek v experimentu 4.2.4.2 je zobrazeno na Obrázku 16.



Obrázek 16: Testování infekitivity rostlinných extraktů obsahujících pGR2i: Δ CP-GFP+pDB3 Ω 2: EAQ TMV-CP-YFP v buňkách současně. A) Systémové šíření pGR2i: Δ CP-GFP+pDB3 Ω 2: EAQ TMV-CP-YFP konstruktů v infiltrovaných rostlinách, účinnost 100%, B) Kontrolní rostlina obsahující pouze konstrukt Δ CP-GFP, tvořící pouze modifikovanou virovou RNA, C) přenos rostlinného extraktu, obsahujícího pGR2i: Δ CP-GFP+pDB3 Ω 2: EAQ TMV-CP-YFP na zdravou rostlinu, 4. den od infiltrace, sledováno pod přirozeným světlem D) přenos rostlinného extraktu obsahujícího pGR2i: Δ CP-GFP+pDB3 Ω 2: EAQ TMV-CP-YFP na zdravou rostlinu, 4. den od infiltrace, sledováno pod UV světlem za pomoci žlutého fluorescenčního filtru, E) stejný vzorek, 6. den od mechanické infekce, je patrné zvětšování infekčních ložisek.

4.2.4.3 Ověření infekčnosti virové RNA přenosem extraktů lišících se přítomností OAS z rostliny na rostlinu

Pro systémové šíření viru jsou nezbytné virové částice, které mohou vznikat pouze při současné existenci virové RNA a kapsidového proteinu viru v jedné buňce. Z tohoto důvodu byla použita současná agroinfiltrace rostlin dvěma vektory, z nichž jeden nesl informaci pro expresi a tvorbu virového kapsidového proteinu, druhý kódoval sekvenci virové RNA s různou modifikací. V případě tohoto experimentu byl do rostlin infiltrován ještě další konstrukt, produkující RNA viru tabákové mozaiky, ale obsahující jiný fluorescenční detekční marker (dsRED). Ten byl použit jako vnitřní standard pro normalizaci výsledků. Rostlinné extrakty byly přeneseny mechanickou infiltrací pomocí karborundového prášku.

Infektivita a četnost vzniklých VLPs (virus-like particles) částic viru tabákové mozaiky v jednotlivých kombinacích konstruktů s a bez sekvence OAS byla testována přenosem vytvořených extraktů z rostlin (viz experiment 4.2.4.1) infiltrovaných na rostliny zdravé. Infektivita částic byla odvozena od počtu infekčních ohnisek, vzniklých na mechanicky inokulovaných rostlinách. Infekční ložiska byla pozorována pod osvětlením rostliny světlem o vhodné vlnové délce za použití barevného filtru (Roscolux, USA), umožňujícího sledovat jak červená, tak zelená fluorescenční ohniska.

Cíle experimentu

- Sledovat nutnost sekvence OAS pro vznik virových částic.
- Potvrdit vznik částic na základě pozorování infekčních ohnisek pomocí jednotlivých fluorescenčních markerů.
- Detekovat vzniklé virové částice pomocí imunochemických metod.
- Detekovat vzniklé částice pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Provedení experimentu

Použité konstrukty:

- 6) pGR2i: Δ OAS2-ACP-GFP
- 7) pGR2i: Δ CP-GFP
- 8) pDB1 α 2: 35S-TMV- Δ CP-dsRED
- 9) pDB3 Ω 2: EAQ PVX-CP-YFP
- 10) pDB3 Ω 2: EAQ TMV-CP-YFP

Kombinace vzorků, přenášených na zdravé experimentální rostliny *Nicotiana benthamiana* jsou uvedeny v Tabulce 22.

Pro přenos extraktů bylo nutné použití rostlin *Nicotiana benthamiana*-3H z důvodu delece pohybového proteinu (MP) v konstruktu bez sekvence OAS.

Tabulka 22: Přenášené rostlinné extrakty, obsahující různé kombinace konstruktů.

Číslo vzorku	přenášený vzorek	typ rostliny	typ vzorku
1	pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED + pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-3H</i>	experimentální vzorek bez přítomnosti sekvence OAS v exprimované RNA, kombinace se specifickým CP (TMV-CP)
2	pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED + pDB3Ω2: EAQ PVX-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-3H</i>	negativní kontrola exprimující RNA bez přítomnosti OAS sekvence a obsahující CP jiného viru (nespecifický PVX-CP)
3	pGR2i: ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED + pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-3H</i>	experimentální vzorek s přítomností sekvence OAS v exprimované RNA, kombinace se specifickým CP (TMV-CP)
4	pGR2i: ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED + pDB3Ω2: EAQ PVX-CP-YFP	<i>Nicotiana b.-3H</i>	negativní kontrola exprimující RNA s přítomností OAS sekvence a obsahující CP jiného viru (nespecifický PVX-CP)
5	pGR2i: ΔCP-GFP + pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED	<i>Nicotiana b.-3H</i>	negativní kontrola bez přítomnosti CP

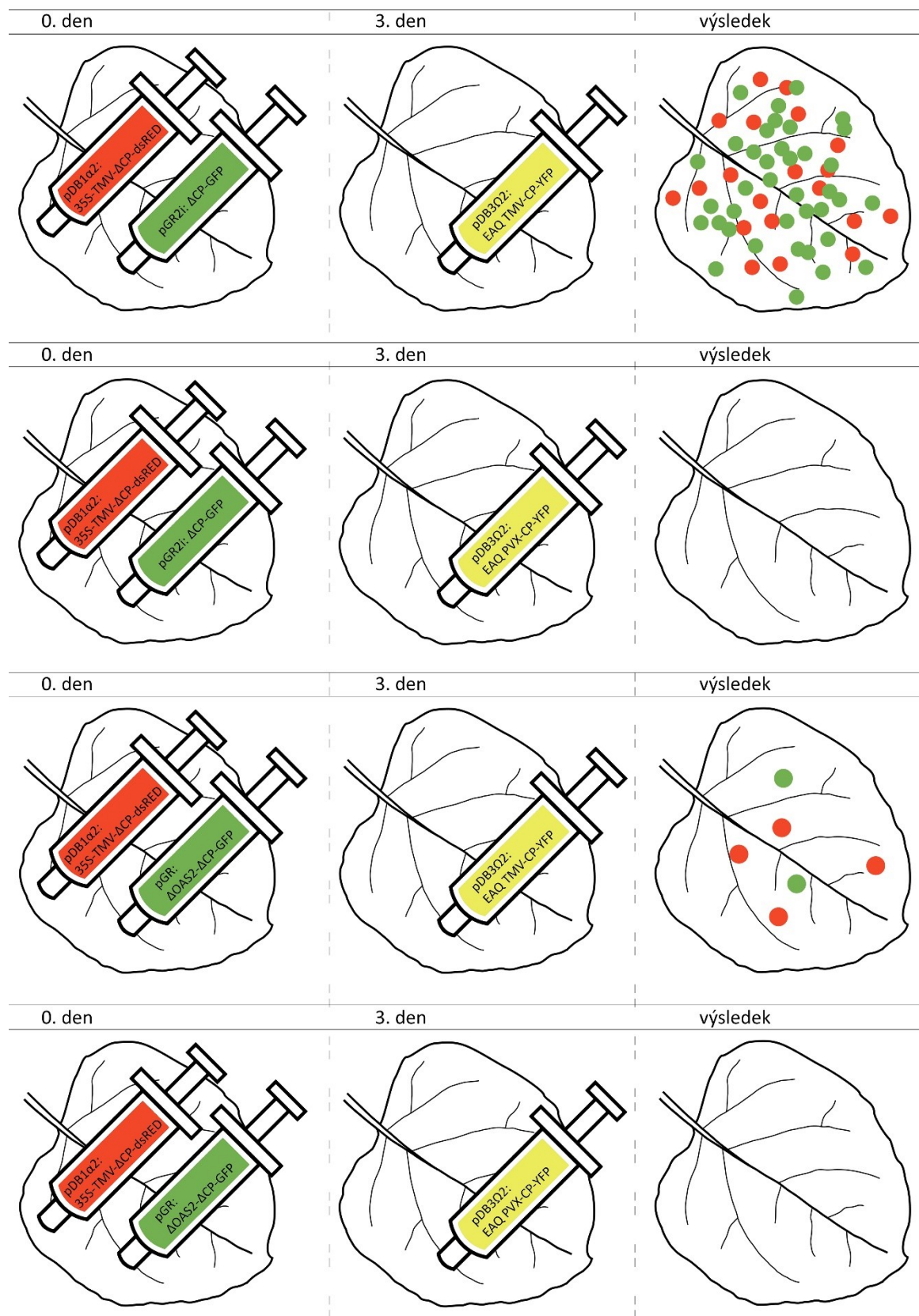
Výsledky experimentu

Výsledek experimentu a podrobné informace o vzájemných kombinacích konstruktů v jednotlivých pokusných rostlinách jsou přehledně popsány v Tabulce číslo 23. Zjednodušené schéma infiltrace rostlin je zobrazeno jako Schéma č. 1 a výsledky experimentu jsou uvedeny v Grafu 1 a na Obrázku 17.

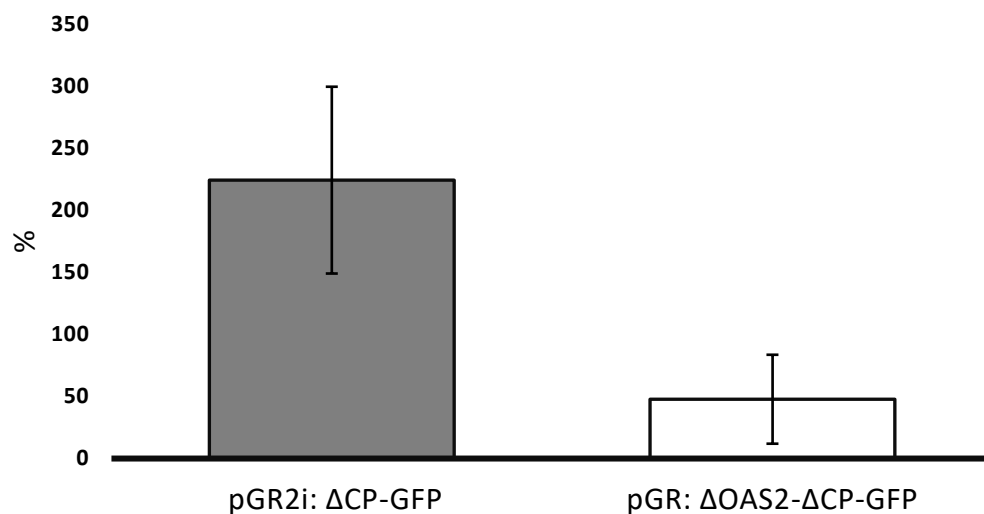
Tabulka 23: Výsledky přenosu extraktů z infiltrovaných rostlin na rostliny zdravé. Tabulka obsahuje počty infekčních ložisek, vytvořených různými kombinacemi vzorků, standardisovaných na konstrukty obsahující dsRED (vnitřní standard pro normalizaci výsledků)

+	pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP		pDB3Ω2: EAQ PVX-CP-YFP	
pGR2i: ΔCP-GFP pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED	infekční ložiska		infekční ložiska	
	GFP	dsRED	GFP	dsRED
	23	8	0	0
	34	10	0	0
	12	6	0	0
	37	19	0	0
	47	35	0	0
	79	42	0	0
průměr	38,67	20,00	0	0
poměr dsRED:GFP	1,93 : 1		-	
+	pDB3Ω2: EAQ TMV-CP-YFP		pDB3Ω2: EAQ PVX-CP-YFP	
pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP pDB1α2:35S-TMV-ΔCP-dsRED	infekční ložiska		infekční ložiska	
	GFP	dsRED	GFP	dsRED
	1	4	0	0
	4	11	0	0
	3	4	0	0
	2	2	0	0
	1	2	0	0
	0	2	0	0
průměr	1,83	4,17	0	0
poměr dsRED:GFP	0,44 : 1		-	

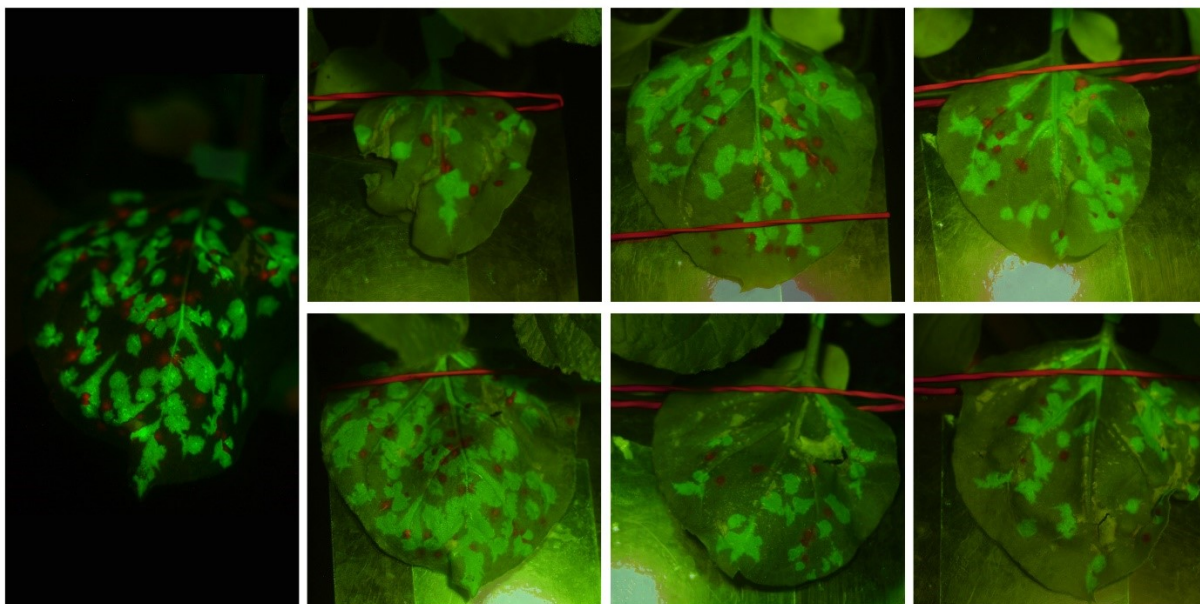
Schéma 1: Přenos extraktů z infiltrovaných rostlin na rostliny zdravé a ověření infekčnosti vzniklých částic.



Graf 1: Relativní množství infekčních



Relativní množství ohnisek způsobených konstrukty, obsahujícími sekvenci OAS nebo její delecí. K porovnání infekčnosti dvou konstruktů bylo použito statistické metody T-test dvou výběrů se shodným rozptylem, $p=000408$. Normalizace počtu GFP ohnisek byla provedena za pomoci ohnisek konstruktů kódujícího dsRED, použitého jako vnitřní standard.



Obrázek 17: Vzniklé fluorescenční léze, vyznačující místa šířící se virové infekce, mechanicky přenesené na indikátorové rostliny infekčním extraktem. Červené léze, pozorované na obrázcích jsou způsobeny přenosem enkapsidované RNA, kódované v konstruktu pDB1 α 2:35S-TMV- Δ CP-dsRED, naopak zelené zabarvení lézí je způsobeno přenosem enkapsidované RNA konstruktů pGR2i: Δ OAS2- Δ CP-GFP. Obrázky vznikly složením barevných kanálů ze dvou fluorescenčních snímků složených do jednoho snímku.

Z výsledků přenosových experimentů vyplývá, že největší množství lézí vzniklo kombinací konstruktů pGR2i: Δ CP – GFP + pDB1 α 2:35S – TMV – Δ CP – dsRED + pDB3 Ω 2: EAQ – TMV – CP – YFP. V této kombinaci vzniká modifikovaná RNA viru tabákové mozaiky, obsahující delecí kapsidového proteinu CP. Vzniklá RNA ve své sekvenci kóduje sekvenci OAS. Kapsidový protein TMV-CP je tvořen vektorem pDB3 Ω 2: EAQ TMV – CP – YFP. Z pozorování také vyplývá, že virová RNA tvořena konstruktem, obsahujícím fluorescenční marker dsRED, dává vzniknout přibližně v polovičním množství infekčních částic než konstrukt s markerem GFP.

V kombinaci, kde byla RNA se zeleným fluorescenčním proteinem zbavena sekvence OAS, se počet infekčních částic snížil přibližně čtyřikrát, tj. přibližně na poměr 0,5:1 oproti kontrolním červeným ložiskům. Pokud je místo TMV-CP tvořen kapsidovým protein PVX-CP, infekční částice vůbec nevznikají. To potvrzuje specifitu interakce virové RNA a odpovídajícího kapsidového proteinu. Závěrem tohoto experimentu je, že absence sekvence OAS v sekvenci virové RNA nevede k úplné ztrátě schopnosti tvořit částice, nicméně je množství částic zhruba čtyřikrát menší než v případě, kdy je sekvence OAS přítomna.

4.2.5 Využití konstruktů, založených na pRIC systému virových vektorů

pRIC expresní konstrukty byly založeny na vektorovém systému, odvozeném od viru žluté zakrslosti fazolu (BeYDV). Jde o v jádře se replikující DNA virus, který umožňuje zvýšit počet kopií T-DNA v jedné buňce na řádově 1000 až 10.000 a tím i dosáhnout silné exprese. Záměrem bylo otestovat systém, ve kterém by v jádře se replikující virus vytvářel a do cytoplasmy posílal velká množství mRNA, která by byla průběžně kompletována do VLPs částic.

Cíle experimentu

- Vyzkoušet využití jiného virového konstruktu na základě obdobného, v předchozích experimentech již používaného systému dvou virových konstruktů (jeden exprimuje RNA obsahující OAS sekvenci a druhý geny, z nichž se následně tvoří virový kapsidový protein).

Provedení experimentu

Použité konstrukty

- 1) pDB3Ω1: RIC 103 (ilustrační schéma konstruktů uvedeno na straně 50)
- 2) pDB3Ω1: RIC 105 (ilustrační schéma konstruktů uvedeno na straně 51)
- 3) pDB3Ω1: RIC 106 (ilustrační schéma konstruktů uvedeno na straně 51)

Kombinace vzorků, koinfiltrovaných do experimentálních rostlin *Nicotiana benthamiana* jsou uvedeny v Tabulce 24.

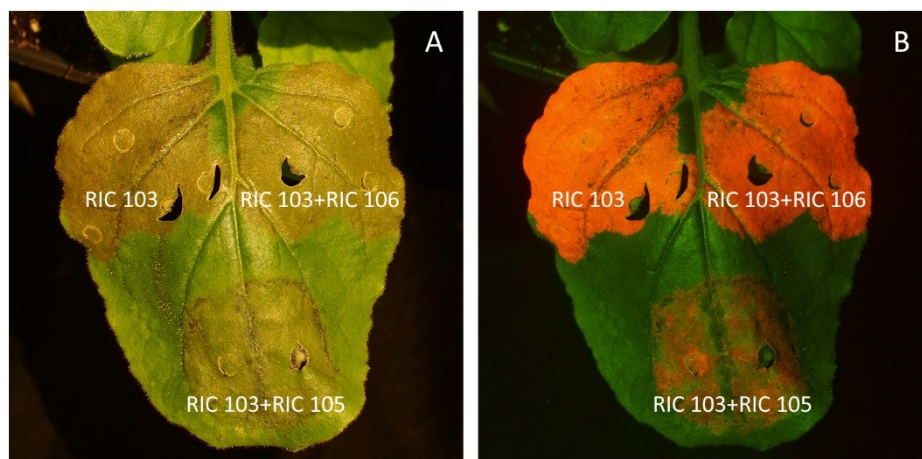
Tabulka 24: Schéma infiltrace za využití pRIC konstruktů, replikujících se v jádře buňky.

Číslo vzorku	infiltrovaný vzorek	typ rostliny	počet infiltrovaných listů
1	pDB3Ω1: RIC 103	<i>Nicotiana b.-WT</i>	1 rostlina, několik listů, pravý horní sektor
2	pDB3Ω1: RIC 103 + pDB3Ω1: RIC 106	<i>Nicotiana b.-3H</i>	1 rostlina, několik listů, levý horní sektor
3	pDB3Ω1: RIC 103 + pDB3Ω1:RIC105	<i>Nicotiana b.-3H</i>	1 rostlina, několik listů, spodní sektor

Výsledky experimentu

Konstrukt pRIC 103 exprimoval v infiltrovaném materiálu velké množství modifikované virové RNA. Kombinace konstruktů pRIC 103 a pRIC 106 umožnila koexpresi kapsidového proteinu PVX a modifikované virové RNA. Intenzita zbarvení, pozorovaného pomocí dsRED

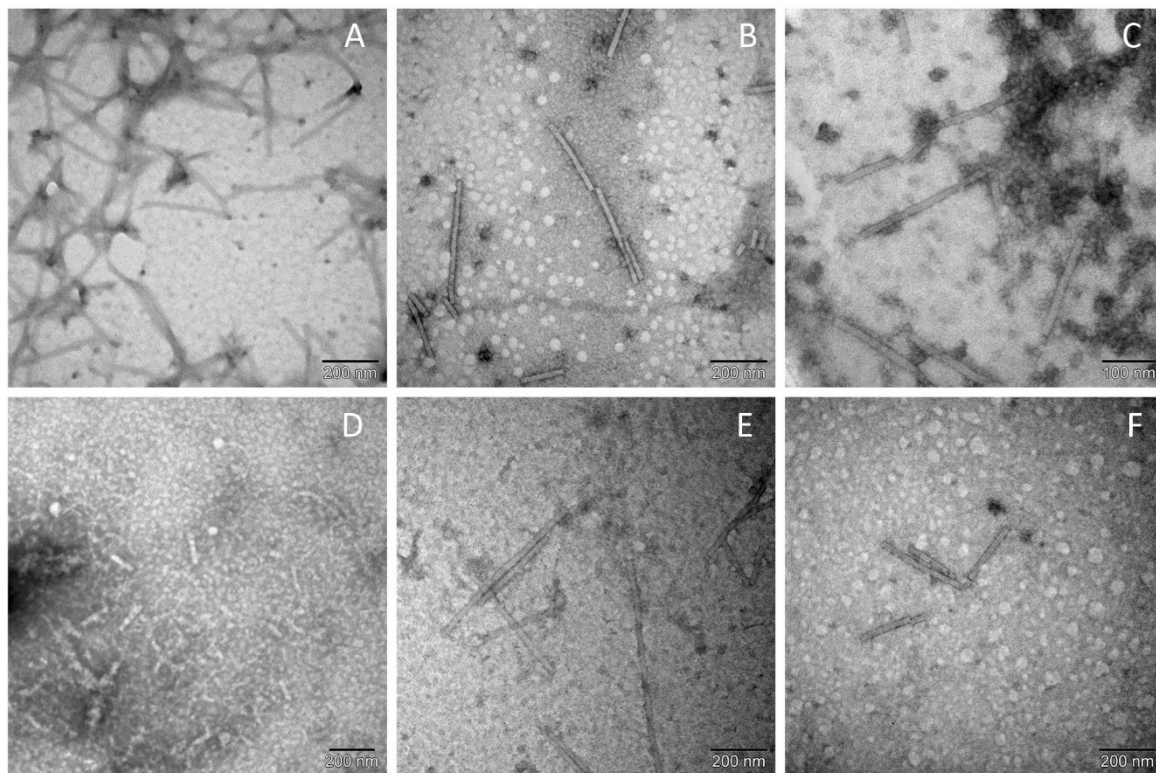
fluorescenčního markeru se nijak nezměnila. Ve spodní části listu byla infiltrována poslední kombinace, při které by se měla dsRED mRNA, obsahující OAS sekvenci TMV a translokovaná z jádra do cytoplasmy, průběžně enkapsidovat kompatibilním kapsidovým proteinem, tvořeným konstruktem pRIC 105. V částicích VLPs zabalená mRNA není translačně aktivní, což se projeví snížením tvorby fluorescenčního markeru dsRED. Provedený experiment je demonstrován na Obrázku 18.



Obrázek 18: Listy *Nicotiana benthamiana* WT, po agroinfiltraci replikujícími se vektory, založenými na viru BeYDV. A) infiltrovaný list, pozorovaný za denního světla, bez umělého osvětlení a filtru B) infiltrovaný list, osvětlený zeleným světlem a pozorovaný pomocí červeného fluorescenčního filtru. Ve spodní části je patrný pokles červené fluorescence, který souvisí s tím, že část RNA je translačně neaktivní, protože je enkapsidována do VLPs.

4.2.6 Zobrazení částic (VLPs) TMV transmisním elektronovým mikroskopem

Pomocí elektronové mikroskopie byly detekovány viru podobné částice (VLPs), vytvořené koinfiltrací dvou různých vektorových systémů, ve kterých měl každý vektor svou specifickou funkci (tvorba RNA nebo CP). Vzniklé částice bylo možné zaznamenat pomocí elektronového mikroskopu a k pořízení a zpracování obrázků (Obrázek 19) byl použit software pro analýzu iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions, Německo).



Obrázek 19: Pomocí transmisního elektronového mikroskopu (FEI Morgagni 268 D) bylo možné vizualizovat virové částice, které vznikly koinfiltrací rostlinného materiálu dvěma konstrukty, z nichž jeden tvořil modifikovanou virovou RNA a druhý kódoval gen, pro tvorbu kapsidového proteinu (CP). A) Vzorek virového purifikátu TMV, B) vzorek pGR2i: Δ CP-GFP + pDB3 Ω 2: EAQ TMV-CP-YFP, C) vzorek pGR2i: Δ CP-GFP+ pGR: PVX-U1- Δ CP, D) pDB3 Ω 1: RIC 103 +pDB3 Ω 2: EAQ TMV-CP-YFP, E) vzorek pGR2i: Δ CP-GFP + pDB3 Ω 2: EAQ TMV-CP-YFP, F) vzorek pGR2i: Δ CP-GFP+ pDB3 Ω 2: EAQ PVX-CP-YFP

RNA viru tabákové mozaiky má velikost cca 300nm, vzniklé VLPs měly proto délku kolem 300nm. Konstrukt pRIC 103 však kódoval velmi krátkou virovou RNA, obsahující 5'-3'NTR oblasti RNA z viru CPMV, fluorescenční detekční marker dsRED a sekvenci TMV-OAS o celkové délce 1550 nt. Z tohoto důvodu jsou částice ve vzorku D kratší než ostatní (očekávaná délka je 70 nm).

5 Diskuse

Dobře objasněný a podrobně prozkoumaný proces tvorby virové částice v prostředí *in vivo* a co nejlépe popsaná struktura virionu, jsou jedny z hlavních předpokladů pro možné biotechnologické využití velkého potenciálu mnohých virů.

Naprostá většina dosud známých informací o procesu tvorby infekční virové částice TMV byla získána na základě experimentů provedených *in vitro*. Tyto experimenty, mimo jiné, poukazovaly na nezbytnost sekvence OAS pro správné započetí enkapsidace RNA viru tabákové mozaiky a na důležitost sekvence AAG AAG UCG a struktury vlásenky, kterou tato sekvence zaujímá (Guilley *et al.*, 1979; Turner & Butler, 1986; Turner *et al.*, 1988;). Dokonce byly provedeny experimenty, při kterých bylo na jednu RNA umístěno hned několik OAS sekvencí. I v tomto případě každá jednotlivá sekvence OAS dala vzniknout struktuře připomínající částici. Pouze však s tím rozdílem, že byly všechny tyto částicové struktury spojeny v jeden celek z důvodů náležitosti sekvencí OAS na jednu RNA (Gallie *et al.*, 1987). Na základě zajímavých výsledků, zveřejněných v diplomové práci Mgr. Lucie Kešnerové (Dlabalová, 2013), poukazující na překvapivou možnost tvorby virové částice v *in vivo* prostředí i v případě delece celé sekvence OAS na enkapsidované RNA, jsme se v této diplomové práci rozhodli navázat na provedené experimenty a zaměřit se na studium průběhu procesu enkapsidace přímo v rostlinných buňkách a rostlinách.

Pro umožnění studia enkapsidace virové RNA v rostlinách byly použity genové konstrukty, založené na několika virových systémech. Vytvořené konstrukty se vzájemně lišily v několika vlastnostech. Při vhodně zvolené kombinaci konstruktů, infiltrovaných do jedné buňky, pomohly tyto konstrukty při studiu hypotéz, navržených v úvodu práce.

V předchozí práci Mgr. Lucie Kešnerové bylo zásadním limitujícím faktorem experimentální práce vytváření nových virových konstruktů. Původní infekční klon byl v buňkách *E. coli* poměrně nestabilní. Stabilitu se podařilo vylepšit vložím sekvence intronu do genu pro replikázu a otočením celé T-DNA vzhledem k replikačnímu počátku plazmidu a genu pro rezistenci ke *kanamycinu*. Přesto se některé experimenty nepodařilo realizovat, protože se nepodařilo vytvořit potřebný konstrukt. Vzhledem k tomu, že Laboratoř virologie, AV ČR začala používat klonovací metodu GoldenBraid (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013; Sarrion – Perdigones *et al.*, 2014), byly využity výhody této metody i v této diplomové práci. Odstraněním restričních míst BsaI a BsmBI byl vytvořen infekční klon viru TMV i PVX. Systém GoldenBraid byl použit i pro konstrukty pRIC a pEAQ. Výhodou tohoto řešení je velká

modularita, schopnost použít identický díl (například kódující TMV-CP nebo fluorescenční marker) ve všech vektorech. Byly vytvořeny konstrukty, které umožnily jak sledovat nezbytnost sekvence OAS, která byla v *in vitro* experimentech označována za nezbytnou (Turner & Butler, 1986), tak závislost tvorby částic na buněčné kompartmentaci.

Pro studium důležitosti sekvence OAS byly vytvořeny konstrukty, lišící se od sebe přítomností, nebo delecí sekvence OAS (u delece byla z genomové RNA odstraněna sekvence OAS i s celým MP proteinem). Dále byly vytvořeny pEAQ konstrukty, exprimující samostatný TMV – CP v cytoplasmě. Pomocí těchto konstruktů se podařilo potvrdit, že částice v rostlinách opravdu vznikají, a to i bez přítomnosti sekvence OAS na sekvenci RNA. Množství vzniklých částic však bylo nižší než v případě viru s divokým typem OAS. Při koinfiltraci rostlinného materiálu virovým konstruktem s přítomností OAS (pGR2i: ΔCP-GFP) a pEAQ konstruktem, tvořícím TMV-CP (pDB3Ω2: pEAQ TMV-CP-YFP) vzniklo více částic (zhruba čtyřikrát) než při koinfiltraci stejného pEAQ konstruktu s konstruktem nesoucím delecí OAS sekvence (pGR2i: ΔOAS2-ΔCP-GFP). Experiment byl normalizován pomocí TMV vektoru značeného červeným markerem dsRED. Výsledkem tohoto experimentu je jednak kvantitativní odhad příspěvku sekvence OAS k enkapsidaci virové RNA, a také důkaz, že infekční virové částice mohou vznikat i tehdy, pokud je kapsidový protein produkován mimo virové replikační továrny volně v cytoplasmě (Sainsbury *et al.*, 2009; Peyret & Lomonossoff, 2013).

V prvních experimentech byly všechny použité konstrukty infiltrovány současně, což se ukázalo jako nevhodné. Později jsme přikročili k tomu, že jsme do rostlin nejprve infiltrovali TMV konstrukt a až poté konstrukt pEAQ. Bylo obtížné správně odhadnout časový interval, ve kterém se exprese obou konstruktů vzájemně optimálně setká v rámci jedné infiltrované buňky. Každý typ použitého konstruktu je založený na jiném viru a funguje s jinou časovou dynamikou. Srovnáme-li známé doby dosažení maximální exprese z jednotlivých vektorů, získáme následující časovou řadu. Nejrychleji dosáhnou maximální exprese nereplikující se vektory řady pEAQ (2 až 3 dny) následované v jádře se replikujícími DNA viry (4 až 5 dní), dále vektory odvozené od TMV (5 až 7 dní) a nakonec vektory odvozené od PVX (10 až 14 dní). Toto pozorování pravděpodobně souvisí s tím, že RNA virových vektorů musí nejprve vytvořit proteiny nutné pro replikaci virové RNA a pak replikační továrny. Expresa kapsidového proteinu (respektive fluorescenčního markeru) následuje až poslední v řadě. Navíc k dosažení měřitelné exprese je nutné, aby se virová infekce rozšířila z počátečních několika málo buněk do podstatné části listu. Naproti tomu vektory nereplikující se, nebo replikující se v jádře, jsou aktivní ve většině buněk infiltrované oblasti okamžitě a nemusí se šířit. Pro tvorbu částic

je nutné, aby nejprve došlo k tvorbě replikačních továren a velkého množství genomové RNA a teprve poté je zapotřebí exprese kapsidového proteinu. Je známo, že pokud se v buňkách nachází kapsidový protein již před nebo na začátku virové infekce, dochází k jejímu zastavení. Na tomto principu vznikly první transgenní rostliny s resistencí proti viru (Powell *et al.*, 1986; Powell *et al.*, 1990). U kombinace virů TMV (produkce RNA) a PVX (TMV-CP) je správného pořadí obou jevů přirozeně dosaženo, protože nástup infekce PVX je pomalejší. U kombinace TMV (produkce RNA) a pEAQ (CP) je naopak při současné infiltraci pořadí opačné. V experimentech jsme se tento problém snažili řešit tím, že byl nejprve do rostliny infiltrován konstrukt tvořící TMV-RNA a po 3-5 dnech byl na stejné listy aplikován druhý, pEAQ konstrukt, což vedlo ke vzniku virových částic a rozvoji systémové virové infekce. V některých experimentech však ke vzniku částic a rozvoji systémové infekce nedošlo. Hypotézou je, že vzájemné načasování obou jevů je kritické a není jednoduché nalézt správný interval, při kterém se pravděpodobnost výskytu částic zvyšuje. Příliš časná infekce vektorem pEAQ vede k rezistenci, zatímco při příliš pozdní infekci je ve většině infikovaných buněk již relativně slabá nová proteosyntéza a nedochází k tvorbě dostatečného množství TMV-CP. Tomu odpovídají i obtíže při detekování přítomnosti TMV-CP pomocí metody Western blot a nízká nebo žádná fluorescence odpovídající YFP markeru, který by měl být koexprimován spolu s TMV-CP.

Zajímavé je také srovnání našich výsledků s experimenty provedenými v diplomové práci Mgr. Kešnerové (Dlabalová, 2013). Pokud se do buňky infiltrovaly dva replikující se virové vektory (Dlabalová, 2013), vznikalo více částic než v experimentech provedených v této diplomové práci. Pro produkci kapsidového proteinu byl v této práci využit nereplikující se vektor řady pEAQ. Jednak jsme chtěli ověřit schopnost kapsidového proteinu produkovaného mimo replikační továrny enkapsidovat virovou RNA a jednak jsme si slibovali, že množství vytvořeného TMV CP a tím i infekčních částic bude vyšší než v případě vektoru PVX. Vektory řady pEAQ jsou rutinně používány pro nadměrnou expresi farmaceutických a dalších proteinů a dosahují nejvyšších popisovaných výtěžků v porovnání s ostatními konstrukty (Sainsbury *et al.*, 2009; Sainsbury *et al.*, 2010; vlastní pozorování a výsledky). Tyto předpoklady se podařilo ověřit jen z části. Infekční virové částice se vytvořit podařilo (důkazem může být systémový přenos, mechanická infekce i pozorování v TEM) nicméně množství exprimovaného CP a částic bylo překvapivě malé, pod hranici detekce standardního Western blotu. Domníváme se, že důvodem je obtížnost správné časové synchronizace (diskutováno výše).

Tématika specifické interakce RNA s TMV CP začíná být opět ve středu zájmu vědeckých týmů i jinde ve světě. V loňském roce vyšla práce popisující experimenty, ve kterých byl využit systém dvou vektorů pEAQ produkující VLPs částice (Lomonossoff *et al.*, 2017). V citované práci je popisován systém, kde jsou jak obalovaná RNA tak TMV-CP produkovány nereplikujícím se pEAQ vektorem. I v tomto případě vznikalo větší množství částic v porovnání s výsledky experimentů v této diplomové práci. Možným vysvětlením tohoto zjištění je opět již diskutovaná vzájemná (ne)-kompatibilita replikujících se a nereplikujících se vektorů. V případě experimentů z laboratoře dr. Lomonossova, využívající pEAQ konstrukty, se oba konstrukty nacházely ve stejném buněčném kompartmentu, a to zároveň a ve stejném čase. Naproti tomu v experimentech provedených v této diplomové práci se díky využití dvou různých konstruktů, založených na jiných virech, vyskytují konstrukty v počátečních fázích po infiltraci v jiném buněčném kompartmentu (virový konstrukt pGR2i v replikačních továrnách v cytoplasmě buňky, zatímco mRNA a z ní translatovaný CP pocházející z pEAQ nebo pRIC plazmidů se nachází volně v cytoplasmě).

V práci bylo také zamýšleno detekovat vznikající částice na základě imunochemických detekčních metod. Nevýhodou imunochemické metody Western blot, která byla použita, je její technická a zejména časová náročnost a omezený počet vzorků, které lze paralelně hodnotit. Bohužel se nepodařilo citlivost této metody zvýšit natolik, abychom dokázali rutinně detekovat menší množství kapsidového proteinu, než jaké je běžné při přirozené infekci TMV (detekční limit stanoven na 15 ng/10 µl vzorku pro SDS-PAGE). Pro další práci jsme se proto rozhodli klasické metody detekce, z důvodů časové úspory a ceny, nahradit imunochemickou metodou komerčních Imunostripů (Agdia, USA), používané k detekci infekčního rostlinného materiálu v zemědělství. Tato metoda se ukázala jako velmi citlivá a rychlá alternativa pro laboratorní imunochemické testy, ale neposkytuje kvantitativní údaje. V budoucnu bychom rádi zopakovali optimalizaci metody Western blot, aby bylo možné odhadnout množství produkovaného CP, případně jeho velikost, což může být nutné v případě kapsidových proteinů, nesoucích další funkční skupiny, epitopy nebo jiné peptidy.

Domnívám se, že i přes dílčí neúspěchy tato práce přispěla k našemu poznání specifické interakce virové RNA s kapsidovým proteinem *in vivo*. Byl kvantifikován příspěvek OAS sekvence k tvorbě částic a dokázán vznik částic v případě, že kapsidový protein je produkován mimo replikační továrny v cytoplasmě. Dále byly vytvořeny důležité vektory a části systému GoldenBraid, které umožňují provedení dalších experimentů v budoucnosti. Expres kapsidového proteinu pomocí nového nereplikujícího se vektoru pEAQ se ukázala jako

překvapivě slabá a málo reprodukovatelná a pro masivní produkci pro biotechnologické využití nevhodná. Domníváme se, že hlubší znalosti o kritických parametrech a mechanismu enkapsidace virové RNA v podmínkách *in vivo* jsou nutnou podmínkou biotechnologického využití tohoto systému a účinného využití viru tabákové mozaiky v budoucnosti.

Závěry

Tato práce si kladla za cíl upřesnit specifičnost procesu enkapsidace RNA viru tabákové mozaiky v podmínkách *in vivo*.

K tomu jsme si vytyčili několik cílů:

- 1) Vytvoření genových konstruktů pro nezávislou produkci enkapsidované RNA a příslušného kapsidového proteinu, odvozených od několika virových systémů.
 - Klonovací metodou GoldenBraid se povedlo vytvořit velké množství genových konstruktů, díky kterým bylo možné sledovat vybrané aspekty virové enkapsidace.
- 2) Zhodnocení vlivu specifické sekvence OAS v průběhu iniciace virové enkapsidace.
 - Pomocí konstruktů, lišících se v přítomnosti sekvence OAS byl stanoven příspěvek OAS k tvorbě virových částic. Zároveň bylo potvrzeno, že tato sekvence není pro tvorbu částic podmínkou nutnou.
- 3) Zhodnocení vlivu buněčné kompartmentace na tvorbu částic.
 - Pomocí experimentů, ve kterých byl TMV-CP exprimován buď pomocí replikujícího se viru (PVX) nebo pomocí nereplikující se cytoplasmatické mRNA bylo zjištěno, že prostory replikačních továren nejsou nezbytně nutné pro vytvoření částice viru tabákové mozaiky. Nicméně tvorba částic v případě replikujícího viru byla výrazně efektivnější.
- 4) Detekce částic a ověření jejich infekčnosti
 - Virové částice byly pozorovány pod elektronovým mikroskopem. Pomocí Imunodetekčního stripu (Agdia, USA) byla detekována přítomnost CP v rostlinných buňkách a pomocí fluorescenčních markerů, zaklonovaných v jednotlivých konstruktech bylo možné detekovat šířící se virovou infekci, která se může systémově nebo mezi rostlinami šířit pouze za přítomnosti infekčních virových částic. Velikost částic byla přibližně odhadnuta na 300 nm, nebyla však provedena kvantitativní analýza délky částic z důvodů jejich malého množství ve vzorku. Infekčnost částic byla potvrzena přenosovými experimenty extraktů, vytvořených z infiltrovaných rostlin na rostliny zdravé.

6 Seznam literatury

Angell, S., M., Davies, C., Baulcombe, D., C., (1996). Cell-to-Cell Movement of Potato Virus X Is Associated with a Change in the Size-Exclusion Limit of Plasmodesmata in Trichome Cells of *Nicotiana clevelandii*. *Virology*, 216 (1), s. 197–201.

Baltes, N., J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P., A., Voytas, D., F., (2014). DNA Replicons for Plant Genome Engineering. *The Plant Cell*, 26, s. 151–163.

Beijerinck, M. W. (1898). Über ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. *Verhandelingen der Koninklijke akademie van Wetenschappen te Amsterdam*, 5, s.3 – 21.[English translation published in 1942. Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. Phytopathological Classics Number 7]

Bernal, J. D., Fankuchen, I., (1941). X-Ray and Crystallographic Studies of Plant Virus Preparations : I. Introduction and Preparation of Specimens II. Modes of Aggregation of the Virus Particles. *The Journal of general physiology*, 25 (1), s. 111–146.

Bloomer, A. C., Champness, J. N., Bricogne, G., Staden, R., Klug, A., (1978). Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits. *Nature*, 276, s. 362–368.

Butler, P., J., G., (1984). The Current Picture of the Structure and Assembly of Tobacco Mosaic Virus. *The Journal of General Virology*, 65, s. 253–279.

Butler, P., J., G., (1999). Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 354 (1383), s.537–550.

Butler, P., J., G., Durham, A., C., Klug, A., (1972). Structures and Roles of the Polymorphic Forms of Tobacco Mosaic Virus Protein: IV. Control of mode of aggregation of tobacco mosaic virus protein by proton binding. *The Journal of Molecular Biology*, 72 (1), s. 1–18.

Cann, A. J., (2011). Principles of Molecular Virology, 5th Edition. *Elsevier Academic Press*, University of Leicester, Great Britain.

Caspar, D. L. D., Holmes, K. C., (1969). Structure of dahlmense strain of tobacco mosaic virus: a periodically deformed helix. *The Journal of molecular biology*, 46(1), s.99–133.

Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G., Zambryski, P., (1990). The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell*, 60 (4), s.637–647.

Czapar, A., E., Zheng, Y., Riddell, I., A., Shukla, S., Awuah, S., G., Lippard, S., J., Steinmetz, N., F., (2016). Tobacco Mosaic Virus Delivery of Phenanthriplatin for Cancer therapy. *ACS Nano*, 10 (4), s. 4119–4126.

- Čermák, T., Baltes, N., J., Čegan, R., Zhang, Y., Voytas, D., F., (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biology*, 16 (232), s. 1–14.
- Deom, C. M., Oliver, M. J., Beachy, R. N. (1987). The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science*, 237 (4813), s.389–394.
- Ding, B., Haudenschild, J., S., Hull, R., J., Wolf, S., Beachy, R., N., W., J., Lucas (1992). Secondary Plasmodesmata Are Specific Sites of Localization of the Tobacco Mosaic Virus Movement Protein in Transgenic Tobacco Plants. *The Plant Cell*, 4 (8), s. 915–928.
- Dlabalová, L., (2013): In planta production of TMV (tobacco mosaic virus) nanoparticles of specific length. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Dujardin, E., Peet, C., Stubbs, G., Culver, J., N., Mann, S., (2003). Organization of Metallic Nanoparticles Using Tobacco Mosaic Virus Templates. *Nano Letters*, 3 (3), s. 413–417.
- Durham, A. C., Finch, J. T., Klug, A. (1971). States of aggregation of tobacco mosaic virus protein. *Nature: New biology*, 229 (2), s. 37–42.
- *Durham, A. C., Klug, A. (1971). Polymerization of Tobacco Mosaic Virus Protein and Its Control. *Nature: New biology*, 229 (2), s. 42–46.
- Durham, A., C., (1972). Structures and Roles of the Polymorphic Forms of Tobacco Mosaic Virus Protein: I. Sedimentation Studies. *The Journal of Molecular Biology*, 67 (2), s. 289–296.
- Dymoc, D., Risiott, R., Pater, S., Lancaster, J., Tillson, P., Oons, G., (1991). Regulation of *Agrobacterium tumefaciens* T-cyt gene expression in leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) is strongly influenced by plant culture conditions. *Plant Molecular Biology*, 17 (4), s. 711–725.
- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., Marillonnet, S., (2009). Golden gate shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type IIS restriction enzymes. *PLoS ONE*, 4(5)
- Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S., (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE*, 3 (11)
- Fang, R., X., Nagy, F., Sivasubramaniam, S., Chua, N., H., (1989). Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *The Plant Cell*, 1 (1), s. 141–150.
- Francki, R., I., B., (ed.), Fauquet, C., M., (ed.), Knudson, D., L., (ed.), Brown, F. (ed.) (2012). Classification and Nomenclature of Viruses, Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Springer Science & Business Media*, Berlín, Německo.
- Franklin, R. E., & Klug, A. (1955). The splitting of layer lines in X-ray fibre diagrams of helical structures: application to tobacco mosaic virus. *Acta Crystallographica*, 8, s.777–780.

- Franklin, R. E., Klug, A., Holmes, K. C., (1957).** X-ray diffraction studies of the structure and morphology of tobacco mosaic virus. **Wolstenholme, G. E.W. (ed.), Millar, E. C. P. (ed.) (2009).** The nature of viruses, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, The United States of America, s.39–54.
- Gallie, D. R., Walbot, V., (1990).** RNA pseudoknot domain of tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells. *Genes & development*, 4 (7), s. 1149–1157.
- Gallie, D., R., Plaskitt, K., A., Michael, T., Wilson, A., (1987).** The effect of multiple dispersed copies of the origin-of-assembly sequence from TMV RNA on the morphology of pseudovirus particles assembled in vitro. *Virology*, 158(2). s. 473–476.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A., Raccach, B., (1990).** Nucleotide sequence of the zucchini yellow mosaic virus capsid-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 87 (2), s. 273–277.
- Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S., (2007).** Viral vectors for the expression of protein in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2), s.134–141.
- Gleba, Y., Tusé, D., Gritch, A., (2013).** Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Current topics in microbiology and immunology*, 358, s.3–32.
- Goelet, P., Lomonossoff, G. P., Butler, P. J. G., Akam, M. E., Gait, M. J., Karn, J., (1982).** Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academic of Science*, 79 (19), s.5818–5822.
- Gopinath, K., Wellink, J., Porta, C., Taylor, K., M., Lomonossoff, G. P., Kammen, A., (1999).** Engineering Cowpea Mosaic Virus RNA-2 into a Vector to Express Heterologous Proteins in Plants. *Virology*, 267 (2), s. 159–173.
- Guilley, H., Jonard, G., Kukla, B., Richards, K., E., (1979).** Sequence of 1000 nucleotides at the 3' end of tobacco mosaic virus RNA. *Nucleic Acid Research*, 6 (4), s.1287–1308.
- Halweg, C., Thompson, W., F., Spiker, S., (2005).** The Rb7 Matrix Attachment Region Increases the Likelihood and Magnitude of Transgene Expression in Tobacco Cells: A Flow Cytometric Study. *The Plant Cell*, 17 (2), s. 418–429.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. , Mullineaux, P., M., (2000).** pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42 (6), s. 819–832.
- Hesketh, E., L., Meshcheriakova, Y., Thompson, R., F., Lomonossoff, G., P., Ranson, N., A., (2017).** The structures of a naturally empty cowpea mosaic virus particle and its genome-containing counterpart by cryo-electron microscopy. *Scientific Reports*, 7(539), s. 1–10.
- Huang, Z. , Phoolcharoen, W. , Lai, H. , Piensook, K. , Cardineau, G. , Zeitlin, L. , Whaley, K. J., Arntzen, C. J., Mason, H. S. and Chen, Q. (2010).** High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnology and Bioengineering*, 106, s. 9–17.

- Huang,X., El-Sayed,I. H., Qian,W., El-Sayed, M., A., (2006).** Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *Journal of the American Chemical Society*, 128 (6), s. 2115–2120.
- Chapman, S., Kavanagh, T., Baulcombe, D., (1992).** Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal*, 2 (4), s. 549–557.
- Chen, Q., He, J., Phoolcharoen, W., Mason, H., S., (2011).** Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants. *Human Vaccines*, 7 (3), s. 331–338.
- Kausche, G. A., Pfankuch, E., Ruska, H. (1939).** Die sichtbarmachung von pflanzlichem virus im Übermikroskop. *Die Naturwissenschaften*, 27(18), s.292–299.
- King, A.M.Q. (ed.), Adams, M.J. (ed.), Carsten, E.B. (ed.), Lefkowitz, E.J., (2011).** Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press*, New York, The United States of America.
- Klokkenburg, M., Dullens, R., P., A., Kegel, W., K., Erne', B., H., Philipse A., P., (2006).** Quantitative Real-Space Analysis of Self-Assembled Structures of Magnetic Dipolar Colloids. *Physical Review Letters*, 96 (3), s.037203 (1–4).
- Klug A., (1979).** The assembly of tobacco mosaic virus: structure and specificity. *The Harvey Lecture*, 74, s.141–162.
- Klug A., (1999).** The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 354, s.531 – 535.
- Knez, M., Bittner, A., M., Boes,F., Wege, C., Jeske, H., Mai, E., Kern, K., (2003).** Biotemplate Synthesis of 3-nm Nickel and Cobalt Nanowires. *Nano Letters*, 3 (8), s. 1079–1082.
- Knez, M., Kadri, A., Wege, Gösele, U., Jeske, H., Nielsch K., (2006).** Atomic Layer Deposition on Biological Macromolecules: Metal Oxide Coating of Tobacco Mosaic Virus and Ferritin. *Nano Letters*, 6 (6), s. 1172–1177.
- Knoll, M., Ruska, E. (1932).** Beitrag zur geometrischen Elektronenoptik. II. *Annalen der Physik*, s. 641–661.
- Koprowski, H., Yusibov, V., (2001).** The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine*, 19 (17-19), s.2735–2741.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyán, J., (2004).** Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO Journal*, 23, s.876–884.

- Lamprecht, L., R., Kennedy, P., Huddy, S., H., Bethke, S., Hendrikse, M., Hitzeroth, I., I., Rybicki, E., P., (2016).** Production of Human papillomavirus pseudovirions in plants and their use in pseudovirion-based neutralisation assays in mammalian cells. *Scientific Reports*, 6 (20431), s. 1–10.
- Lazarowitz, S., G., Shepherd, R., J., (1992).** Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11 (4), s.327–349.
- Lee, S., Y., Choi, J., Royston, E., Janes, D., Culver, J., N., Harris, M., T., (2006).** Deposition of Platinum Clusters on Surface-Modified Tobacco Mosaic Virus. *American Scientific Publishers*, 6 (4), s. 974–981.
- Liu, L., & Lomonosoff, G. P., (2002).** Agroinfection as a rapid method for propagating Cowpea mosaic virus-based constructs. *The Journal of Virological Methods*, 105 (2), s. 343–348.
- Lomonosoff, G., P., Saunders, K., (2017).** In Planta Synthesis of Designer-Length Tobacco Mosaic Virus-Based Nano-Rods That Can Be Used to Fabricate Nano-Wires. *Frontiers in Plant Science*, 8, s. 1 – 11.
- Lough, T., J., Netzler, N., E., Emerson, S., J., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D., L., Lucas, W., J., Forster, R., L., S., (2000).** Cell-to-Cell Movement of Potexviruses: Evidence for a Ribonucleoprotein Complex Involving the Coat Protein and First Triple Gene Block Protein. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 13 (9), s. 962–974.
- Más, P., & Beachy, R. N., (1999).** Replication of Tobacco Mosaic Virus on Endoplasmic Reticulum and Role of the Cytoskeleton and Virus Movement Protein in Intracellular Distribution of Viral RNA. *The Journal of Cell Biology*, 147(5), s. 945–958.
- Mateusz, W., Kozubek, E., Lehmann, P., (2006).** Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica*, 53 (2), s. 289 – 298.
- Matthews, R., E., F., (1966).** Reconstitution of Turnip Yellow Mosaic Virus RNA with TMV protein Subunits. *Virology*, 30(1), s. 82–96.
- Morozov, S., Y., Lukasheva, L., I., Chernov, B., K., Skryabin, K., G., Atabekov, J., G., (1987).** Nucleotide sequence of the open reading frames adjacent to the coat protein cistron in potato virus X genome. *FEBS Letters*, 213 (2), s. 438–442.
- Murphy, F., A., Fauquet, C., M., Bishop, D., H., L., Ghabrial, S., A., Jarvis, A., W., Martelli, G., P., Mayo, M., A., Summers, M., D., (2012).** Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. *Springer Science & Business Media*, Berlín, Germany.
- Namba, K., Pattanayek, R., Stubbs, G. (1989).** Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus: Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction. *The Journal of Molecular Biology*, 208(2), s.307–325.

- Nayudu, M., V., (2008).** Plant viruses. *Tata Mc Graw-Hill Publishing Company Limited*, New Delhi, India.
- Niehl, A., Soininen, M., Poranen, M.M. and Heinlein, M. (2018).** Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA. *The Plant Biotechnology Journal*, 2018, s. 1–9.
- Odell, J., T., Nagy, F., Chua, N., (1985).** Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313, s. 810–812.
- Okada, Y., & Ohno, T. (1972).** Assembly mechanism of tobacco mosaic virus particle from its ribonucleic acid and protein. *Molecular and General Genetics*, 114(3), s.205–213.
- Palmer, K., E., Rybicki, E., P., (1998).** The Molecular Biology of Mastreviruses. *Advances in Virus Research*, 50, s. 183–234.
- Peyret, H. & Lomonossoff, G.P., (2013).** The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. *Plant Molecular Biology*, 83 (1-2), s. 51–58.
- Pokorski, J., K., Steinmetz, N., F., (2011).** The Art of Engineering Viral Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 8 (1), s. 29–43.
- Powell, A., P., Nelson, R., S., Hoffmann, N., Rogers, S., G., Fraley, R., T., Beachy, R., N., (1986).** Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232 (4751), s. 738–743.
- Powell, A., P., Sanders, P., R., Tumer, N., Fraley, R., T., Beachy, R., N., (1990).** Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology*, 175 (1), s. 124–130.
- Regnard, G., L., Halley-Stott, R., P., Tanzer, F., L., Hitzeroth, I., Rybicki, E., P., (2010).** High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector. *The Plant Biotechnology Journal*, 8 (1), s. 38–46.
- Sainsbury, F., Thuenemann, E. C., Lomonossoff, G. P., (2009).** pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *The Plant Biotechnology Journal*, 7, s.682–693.
- Sainsbury, F., Sack, M., Stadlmann, J., Quendler, H., Fischer, R., (2010).** Rapid Transient Production in Plants by Replicating and Non-Replicating Vectors Yields High Quality Functional Anti HIV Antibody. *PLoS ONE* 5(11): e13976.
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E. E., Zandalinas, S.I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., Orzaez, D., (2011).** GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS One* 6(7), e21622.

- Sarrion-Perdigones, A., Palaci, J., Granell, A., Orzaez, D. (2014).** Design and construction of multigenic constructs for plant biotechnology using the GoldenBraid cloning strategy. *Methods in Molecular Biology*, 1116, s.133–51.
- Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palací, J., Castelijns, B., Forment, J., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A., Orzaez, D., (2013).** GoldenBraid2.0: A comprehensive DNA assembly framework for *Plant Synthetic Biology*, *Plant Physiology Epub*.
- Shaw, J., G., (1999).** Tobacco mosaic virus and the study of early events in virus infections. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 354 (1383), s.603–611.
- Skryabin, K., G., Kraev, A., S., Morozov, S., Y., V., Rozanov, M., N., Chernov, B., K., Lukasheva, L.I., Atabekov, J.G., (1988).** The nucleotide sequence of potato virus X RNA. *Nucleic Acid Research*, 16 (22), s.10929–10930.
- Sonenberg, N., Shatkin, A., J., Ricciardi, R., P., Rubin, M., Goodman, R., M., (1978).** Analysis of terminal structures of RNA from potato virus X. *Nucleic Acids Research*, 5 (7), s. 2501–2512.
- Stanley, J., Boulton, I., M., Davies, J., W., (2001).** Geminiviridae. Nature publishing company, The Encyclopedia of Life Science, *John Wiley & Sons*, s. 1–8.
- Stanley, W. M., (1935).** Isolation of a Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco-Mosaic Virus. *Science*, 81 (2113), s. 644–645.
- Streatfield, S., J., Howard, J., A., (2003).** Plant-based vaccines. *The International Journal for Parasitology*, 33 (5-6), s. 479–493.
- Stubbs, G. (1999).** Tobacco mosaic virus particle structure and the initiation of disassembly. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 354 (1383). s. 551–557.
- Stubbs, G., Warren, S., Holmes, K. (1977).** Structure of RNA and RNA binding site in tobacco mosaic virus from 4-A map calculated from X-ray fibre diagrams. *Nature*, 267, s.216–221.
- Tilsner, J., Linnik, O., Wright, K, M., Bell, K., Roberts, A, G., Lacomme, C., Santa Cruz, S., Oparka, K., J., (2012).** The TGB1 movement protein of potato virus X re-organises actin and endomembranes into the ‘X-body’, a viral replication factory. *Plant Physiology*, 158, s. 1359–1370.
- Tseng, R., J., Chunglin, T., Laping, M., Jianyong, O., Cengiz, S., O., Yang, Y., (2006).** Digital memory device based on tobacco mosaic virus conjugated with nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 1, s.72–77.

Turner, D., R., Butler, P., J., G., (1986). Essential features of the assembly origin of tobacco mosaic virus RNA as studied by directed mutagenesis. *Nucleic Acid Research*, 14 (23), s. 9229–9242.

Turner, R., D., Lorie, E. J., Jonathan, P., Butler, P., J., G., (1988). The Tobacco Mosaic Virus Assembly Origin RNA. Functional Characteristics Defined by Directed Mutagenesis. *The Journal of Molecular Biology*, 203 (3), s. 531–547.

Turner, R., D., McGuigan, C.J., Butler, P., J., G., (1989). Assembly of Hybrid RNAs with Tobacco Mosaic Virus Coat Protein. Evidence for Incorporation of Disks in 5'-Elongation Along the Major RNA Tail. *The Journal of Molecular Biology*, 209 (3), s.407–422.

Zimmern, D., (1975). The 5' end group of tobacco mosaic virus RNA is m⁷G^{5'} ppp^{5'} Gp. *Nucleic acids research*, 2(7), s. 1189–1202.

Zimmern, D., (1977). The nucleotide sequence at the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA. *Cell*, 11(3), s.463–482.